

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**THÈSE PRÉSENTÉE À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE**

**PAR  
MICHELLE BERNIER**

**IMPACT DU MERCURE ET D'AUTRES MODIFICATEURS SUR  
L'INTÉGRITÉ FONCTIONNELLE ET STRUCTURELLE DU  
PHOTOSYSTEME II**

**JUIN 1996**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

*"The photosynthetic process is one of the great schemes of nature on which all life depends and one which is not only of the greatest philosophical interest but of immense practical importance, since it is the primary route of energy supply to the living cell and, consequently, the most important source of energy in our technological world."*

Sir George Porter

(1979) Foreword. Robert Hill: An Eightieth Birthday Tribute.

## RÉSUMÉ

Le photosystème II (PS II) est un complexe membranaire multiprotéique où s'effectue un des processus les plus fondamentaux en biologie, la photooxydation de l'eau. Cependant, ce phénomène qui conduit à la production de l'oxygène que nous respirons, demeure encore largement énigmatique dans ses détails moléculaires. De plus, le PS II est un site de l'appareil photosynthétique hautement sensible à l'action des polluants et des herbicides. Les organismes photosynthétiques sont les piliers de la chaîne alimentaire, il est donc d'une importance capitale de caractériser le mode d'action des composés qui pourraient entraver leur croissance.

Au cours de ce projet de recherche, nous avons tenté de mieux caractériser l'effet sur le PS II d'un composé hautement toxique, le mercure. De plus, nous avons utilisé cet inhibiteur comme "sonde" permettant d'explorer les relations structure-fonction de ce complexe enzymatique. Nos travaux ont été effectués à l'aide de fragments membranaires riches en PS II, aucune étude de l'action du mercure sur ce complexe membranaire isolé n'ayant encore été effectuée.

Le mercure est un puissant inhibiteur de l'activité du PS II et son mode d'action semble hautement spécifique. Il perturbe le côté donneur du PS II en altérant l'équilibre des ions chlorure (cofacteur essentiel au processus de dégagement d'oxygène) et en provoquant la libération d'un polypeptide extrinsèque de 33 kDa (PE33). C'est la première fois que ces composantes spécifiques du PS II sont identifiées comme cibles du mercure. Ce métal agit soit directement sur PE33, soit sur un polypeptide intrinsèque liant PE33; ces deux possibilités sont discutées. De plus, nous avons tenté de déterminer si le mercure modifie un ou des résidus cystéine du PS II, ce métal présentant une affinité exceptionnelle pour ce

résidu. Des études comparatives avec des modificateurs de cystéine et de cystine ont été effectuées et une analyse détaillée des possibilités est présentée.

L'ensemble de ce travail a sans aucun doute apporté de précieuses et nouvelles informations sur le mode d'action du mercure au niveau du PS II, et par surcroît, il a mené à une meilleure compréhension de l'organisation structurale et fonctionnelle de ce complexe multiprotéique. En effet, c'est la première fois qu'un inhibiteur du PS II provoque l'enlèvement exclusif de PE33 sans provoquer l'enlèvement concomitant des deux polypeptides extrinsèques de 23 et 16 kDa qui lui sont étroitement associés. Un nouveau modèle de liaison des polypeptides extrinsèques est proposé. De plus, l'analyse de ces résultats a apporté des informations inédites quant au lien qu'entretient PE33 avec les cofacteurs chlorure et calcium et nous a conduit à proposer un modèle innovateur quant au rôle de PE33 dans le processus de photooxydation de l'eau.

## REMERCIEMENTS

Au cours d'un tel périple, les gens qui ont une contribution significative sont nombreux. J'aimerais d'abord remercier mon directeur de thèse, le Dr. Robert Carpentier, pour son support constant, pour ses judicieux conseils et pour son incomparable patience.

Les compagnons de laboratoire sont aussi omniprésents au cours d'une telle aventure. J'ai eu la chance de travailler dans une équipe où régnait une exceptionnelle camaraderie. Chantal, Johanne, Marc, Nathalie M., Nathalie B., Josée, Manu, Myriam, Yves, Aminata, Ahmed, Waafa, merci pour les nombreux et fructueux échanges scientifiques et "culturels", pour ces innombrables bons moments. Un merci bien spécial à Johanne pour sa grande disponibilité à tous les égards.

Il y a aussi les amis de tous les moments. Je tiens à remercier très spécialement Sonia, pour sa très précieuse amitié, qui s'est traduite par une présence soutenue, une aide incommensurable, une incroyable complicité qui nous a permis de partager sans limite les interrogations, les doutes, les joies et l'émerveillement de scientifiques en devenir.

Je tiens aussi à remercier Serge pour la grande confiance qu'il m'a témoignée, les encouragements soutenus et les rigoureuses discussions scientifiques. Nul doute que sa persévérance, sa grande rigueur intellectuelle et sa passion pour la science m'ont inspirée à tout moment.

Un merci bien spécial à Judith pour m'avoir donné libre accès à ce qu'il y a de plus précieux pour un étudiant gradué, ses articles scientifiques.

Un telle aventure est parfois parsemée d'embûches, et l'appui et la confiance de personnes-clés sont très importants. Je tiens à remercier spécialement M. Julian Gruda pour sa grande disponibilité, sa grande compréhension et son aide précieuse à des moments plutôt critiques de l'aventure.

L'important support financier de divers organismes ne peut pas être passé sous silence. Je tiens à remercier le Conseil National de Recherche en Sciences et en Génie, la Fédération des Femmes Diplômés d'Université, la Fondation Desjardins, Environnement Canada et ses partenaires, le Syndicat des chargés de cours de l'U.Q.T.R, l'Association des cadres de l'U.Q.T.R. ainsi que la Fondation C.E.U. pour la confiance qu'ils m'ont témoignée en me supportant financièrement.

Aux membres de ma famille, dont mes nièces et neveux qui me trouvaient bien grande pour être "encore à l'école" et pas tellement disponible pour les choses "plus amusantes", merci d'avoir toujours respecté mon choix et de m'avoir supporté constamment. Un merci spécial à Julie et Geneviève pour leurs encouragements et pour avoir suivi le dossier de si près.

Je tiens à adresser le dernier mot mais non le moindre à René, mon compagnon de vie. Merci d'abord pour ton dicton si précieux: "Never stop paddling in the wave", merci infiniment pour ton support de tous les instants, ton écoute indéfectible, ta grande compréhension et la confiance sans borne que tu m'as témoignée. Ta présence à mes côtés n'est vraiment pas étrangère à mon arrivée à bon port.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS .....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES .....	xi
LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS.....	xiv
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION .....	1
1.1 - La photosynthèse.....	2
1.1.1- Généralités.....	2
1.1.2- Le chloroplaste .....	2
1.1.3- Les thylacoïdes .....	6
1.2 - Le photosystème II .....	10
1.2.1- Généralités.....	10
1.2.2- Organisation structurelle du photosystème II .....	11
1.2.3- L'organisation fonctionnelle du PS II .....	22
1.3- Le mercure .....	33
1.3.1- Généralités.....	33
1.3.2- Contamination de l'environnement par le mercure.....	34
1.3.3- Les effets du mercure sur les organismes photosynthétiques.....	36
1.4 - Objectifs de la recherche .....	39
1.4.1- Objectifs généraux .....	39
1.4.2- Objectifs spécifiques.....	42
1.5 - Importance et originalité de la recherche.....	46



## CHAPITRE 2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....50

2.1- Approche générale.....	50
2.2- Choix et préparation du matériel d'étude .....	51
2.2.1- Préparation des fragments membranaires riches en PS II .....	51
2.3- Traitements des FMRPSII.....	57
2.3.1- Traitement au mercure et autres modificateurs.....	57
2.3.2- Enlèvement des polypeptides extrinsèques.....	58
2.4- Méthodes analytiques .....	59
2.4.1- Séparation des protéines par électrophorèse .....	59
2.4.2- Dégagement d'oxygène par polarographie.....	61
2.4.3- Mesure et analyse de la fluorescence.....	63
2.5- Matériel .....	69

## CHAPITRE 3 - RÉSULTATS.....71

3.1- Mise au point de la méthode de préservation des FMRPSII.....	71
3.2- Effets du mercure sur l'intégrité fonctionnelle du PS II .....	80
3.3- Effets du mercure sur l'intégrité structurale du PS II.....	97
3.4- Effets d'autres modificateurs de cystéines sur l'intégrité structurale et fonctionnelle du PS II .....	105

<b>CHAPITRE 4 - DISCUSSION .....</b>	<b>111</b>
4.1- Mode d'action du mercure sur le PS II .....	111
4.1.1- Le mercure provoque la libération de PE33.....	113
4.1.2- L'effet du mercure peut être renversé par les chlorures.....	117
4.1.3- Est-ce que le mercure modifie une ou des cystéines du PS II? ...	121
4.1.4- Quel polypeptide du PS II est affecté par le mercure? .....	124
4.2- L'organisation structurelle et fonctionnelle du PS II.....	135
4.2.1- La liaison des polypeptides extrinsèques.....	135
4.2.2- L'interaction entre PE33 et les cofacteurs .....	139
4.2.3 - Le rôle de PE33 dans le PSII. ....	141
<b>CHAPITRE 5 - CONCLUSION .....</b>	<b>150</b>
<b>CHAPITRE 6 - BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>156</b>

## LISTE DES TABLEAUX

1-	Polypeptides du photosystème II .....	13
2-	Cofacteurs associés au photosystème II.....	15
3-	Teneurs normales et excessives en mercure dans la biosphère .....	35
4-	Sites d'inhibition du mercure le long de la chaîne de transport d'électrons.....	37
5-	Contenu en cystéines des polypeptides du PS II.....	45
6-	Composition des milieux utilisés pour la préparation des FMRPSII .....	53
7-	Composition des gels et des tampons utilisés pour l'électrophorèse.....	60
8-	Explications de la courbe d'induction de fluorescence .....	68
9-	Liste des produits et appareils utilisés.....	69
10-	Effets de divers additifs sur l'activité du PS II.....	87
11-	Effets de trois sels de sodium sur l'activité de dégagement d'oxygène en présence ou en absence de 20 $\mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ .....	95
12-	Effets de divers modificateurs chimiques sur l'intégrité fonctionnelle et structurale du PS II .....	108
13-	Traitements destinés à déloger les polypeptides extrinsèques du PS II.....	114
14-	Concentrations de chlorure et de calcium nécessaires pour une activité de dégagement d'oxygène optimale.....	117

## LISTE DES FIGURES

1.	Représentation schématique de la feuille, de la cellule végétale, du chloroplaste et des thylacoïdes.....	3
2.	Schématisme de la photosynthèse.....	5
3.	Organisation de la membrane du thylacoïde.....	7
4.	Organisation structurale du photosystème II. ....	12
5.	Transferts d'électrons survenant au niveau du photosystème II .....	24
6.	Exemples de modèles illustrant les états redox du manganèse au cours du cycle des états S .....	27
7.	Vue d'ensemble de l'approche expérimentale.....	50
8.	Préparation des fragments membranaires riches en PS II .....	54
9.	Comparaison du profil électrophorétique des FMRPSII et des thylacoïdes. ....	55
10.	Représentation schématique du phénomène de dégagement d'oxygène au PSII et quelques détails sur la méthodologie employée.....	62
11.	Représentation schématique de la dissipation d'énergie au niveau du PS II et détails de la méthodologie pour les mesures d'induction de fluorescence.....	64
12.	Courbes typiques d'induction de fluorescence pour un organisme entier ou des FMRPSII .....	67
13.	Méthodologie expérimentale et description des milieux d'entreposage étudiés pour la mise au point de la méthode de préservation .....	72
14.	Effet du milieu d'entreposage sur l'activité de dégagement d'oxygène des FMRPSII.....	74
15.	Effet du milieu d'entreposage sur l'intensité de fluorescence constante et de fluorescence variable émise par les FMRPSII .....	75
16.	Intégrité fonctionnelle des FMRPSII en fonction du temps d'entreposage dans l'azote liquide en absence et en présence d'éthylène glycol .....	78
17.	Effet du mercure sur l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps.....	80
18.	Effet du mercure sur l'activité de dégagement d'oxygène en fonction de la concentration de deux sels de mercure.....	82

19. A: Emission de fluorescence des FMRPSII en présence de concentrations croissantes de mercure .....	83
B: Emission de fluorescence des FMRPSII en présence ou en absence de mercure et en présence ou en absence d'hydroxylamine.....	83
20. Effet de divers sels sur l'activité du PS II en présence ou en absence de mercure.....	86
21. Effet du mercure sur l'activité du PS II en absence ou en présence de 10 mM TMACl.....	89
22. Dégagement d'oxygène en fonction de la concentration de TMACl en présence de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ .....	91
23. A. Double réciproque du tracé de la figure 22. B. Tracé secondaire de la double réciproque. ....	92
24. Représentation schématique illustrant l'affinité de certains anions avec le mercure ainsi que l'efficacité de ces mêmes anions sur le PS II .....	94
25. Gel d'électrophorèse de diverses préparations de FMRPSII illustrant l'enlèvement de la 33 kDa par le mercure.....	98
26. Contenu en polypeptides des FMRPSII préparés à partir d'orge et d'épinards en fonction de la concentration de mercure.....	99
27. Contenu en polypeptide de 33 kDa des préparations de FMRPSII natives ou départies des polypeptides de 16 et 23 kDa en fonction de la concentration de mercure. ....	101
28. Dégagement d'oxygène et contenu en 33 kDa des FMRPSII en fonction de la concentration de mercure .....	102
29. Gel d'électrophorèse des FMRPSII montrant l'effet des chlorures sur l'enlèvement de PE33 par le mercure. ....	103
30. Effet de divers agents modificateurs sur le dégagement d'oxygène.....	106
31. Gel d'électrophorèse des FMRPSII suite à divers traitements avec des modificateurs de cystéines et de cystines.....	107
32. Vue d'ensemble des résultats et des informations qu'ils apportent sur le mode d'action du mercure de même que sur l'organisation structurale et fonctionnelle du PS II.....	112
33. La cible du mercure .....	124

34. Séquence en acides aminés de PE33 .....	125
35. Séquence en acides aminés des polypeptides CP47 et CP43.....	131
36. Séquence en acides aminés des polypeptides D1 et D2 .....	132
37. Modèle courant de la liaison des polypeptides extrinsèques sur le PS II. ....	136
38. Modèles de liaison des polypeptides extrinsèques du PS II.....	138
39. Modèle illustrant le rôle de PE33 comme barrière d'accessibilité dans le PSII ainsi que l'implication d'un pont disulfure .....	145
40. Modulation par la lumière de certains enzymes du cycle de Calvin-Benson via le système Ferrédoxine/Thiorédoxine.....	147
41. La liaison des polypeptiques extrinsèques du PS II.....	151
42. Effet du mercure sur le PS II.....	154

## LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS

AI	Acide iodoacétique
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	ATP synthétase
CCL I	Complexe collecteur de lumière I (LHC I)
CCL II	Complexe collecteur de lumière II (LHC II)
CDO	Complexe de dégagement d'oxygène
Chl	Chlorophylle
Cys	Cystéine
Cyt	Cytochrome
DCBQ	2,5-dichlorobenzoquinone
DCMU	Dichlorophényl diméthyl urée
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
DTT	Dithiothréitol
DTNB	5,5' - dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
EG	Ethylène glycol
EPR	Résonnance paramagnétique des électrons (electron paramagnetic resonance)
EXAFS	Extended x-ray absorption fine structure
F <sub>max</sub>	Fluorescence maximale
FMRPSII:	Fragments membranaires riches en photosystème II
F <sub>o</sub>	Fluorescence constante
F <sub>v</sub>	Fluorescence variable
F <sub>vmax</sub>	Fluorescence maximale variable

K	Constante de formation de complexe (ou de stabilité)
LHC I	Light harvesting complex I (Voir CCL I)
LHC II	Light harvesting complex II (Voir CCL II)
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
NADP(H)	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NEM	<i>N</i> -éthylmaléimide
P680	Centre réactionnel du PS II
P700	Centre réactionnel du PS I
PC	Phosphatidylcholine
PCMB	p-chloromercuric acid
PCMBS	p-chloromercuriphenyl-sulfonic acid
PE	Polypeptide extrinsèque
PG	Phosphatidylglycérol
Phéo	Phéophytine
PMSF	Phényl methyl sulfonyl fluoride
PQ	Plastoquinone
PQH <sub>2</sub>	Plastoquinol
PS I	Photosystème I
PS II	Photosystème II
Qa	Quinone, accepteur primaire du PS II
Qb	Quinone, accepteur secondaire du PS II
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène diamine
TMA	Tétraméthyl ammonium



TRIS	[Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride]
Tyr Z	Tyrosine Z
u.a.	unités arbitraires
XANES	x-ray absorption near edge structure
Z	Tyrosine, donneur d'électrons du PSII

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

Le photosystème II (PS II) est un complexe membranaire multiprotéique où s'effectue l'important processus de photooxydation de l'eau au cours de la photosynthèse. C'est à ce site crucial de la machinerie photosynthétique qu'est généré l'oxygène que nous respirons. Bien qu'il fasse l'objet d'intenses recherches, ce processus fondamental en biologie demeure encore largement énigmatique dans ses détails moléculaires. De plus, le PS II est un site de la membrane photosynthétique hautement sensible à l'action des polluants et des herbicides (Trebst, 1986, 1980; Rutherford, 1989). On sait que les organismes photosynthétiques sont à la base de la chaîne alimentaire, et il est fort important de caractériser le mode d'action des composés qui peuvent entraver leur croissance.

Au cours de ce projet de recherche, nous tenterons de caractériser l'effet d'un composé hautement toxique, le mercure, sur le PS II. En fait, nous utiliserons ce composé et quelques autres modificateurs comme "sondes" pour des études de relation structure-fonction au PS II, ce dans le but d'une meilleure caractérisation de ce complexe membranaire.

Avant de définir en détails les objectifs et l'importance de ce projet de recherche, ce chapitre sera d'abord consacré à un survol de la photosynthèse, à une description de l'organisation structurelle et fonctionnelle du PS II, ainsi qu'à l'état actuel des connaissances sur le mercure comme inhibiteur de la photosynthèse et du PS II.

## 1.1 - La photosynthèse

### 1.1.1 - Généralités

Lorsqu'une feuille de plante verte est illuminée par le soleil, une partie de l'énergie radiante est utilisée pour promouvoir l'ultime transformation de l'eau et du gaz carbonique en oxygène et en composés organiques, composés qui directement ou indirectement fourniront l'énergie pour toutes les formes de vie sur terre. La photosynthèse, décrite ici d'une façon globale, constitue sans aucun doute le processus le plus fondamental en biologie. Cette transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique stable et utilisable s'effectue chez les algues et chez les plantes supérieures selon un mécanisme complexe à l'intérieur d'une structure hautement organisée, le chloroplaste<sup>1</sup>.

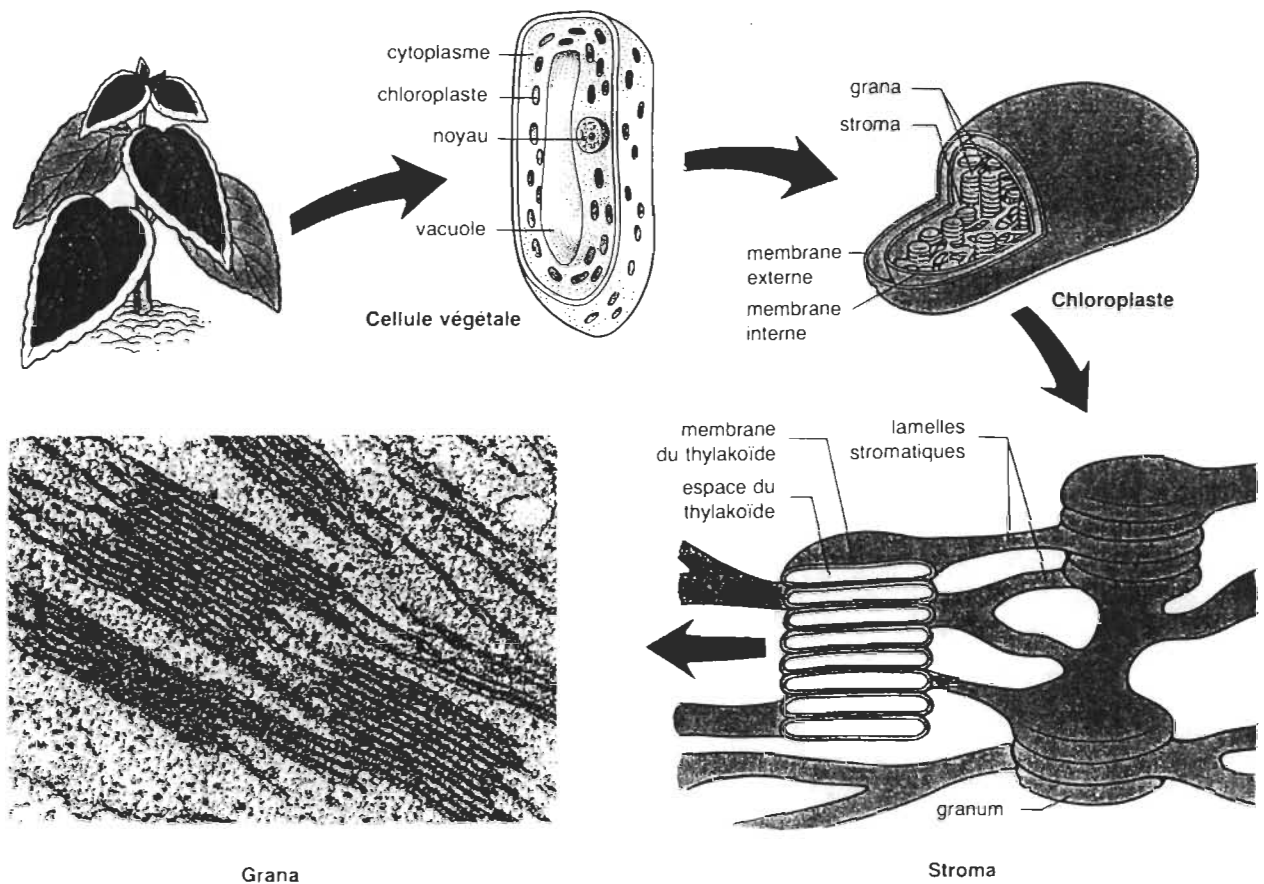
### 1.1.2 - Le chloroplaste

#### 1.1.2.1 - Ultrastructure du chloroplaste

L'architecture membranaire d'un chloroplaste est schématisée à la **figure 1**. L'organe est entouré d'une enveloppe formée de deux membranes fonctionnellement distinctes, la membrane externe et la membrane interne séparées entre elles d'un espace d'environ 20 nm. La membrane interne circonscrit le stroma, un milieu contenant de nombreux enzymes ainsi que de l'ADN, de l'ARN et des ribosomes impliqués dans la synthèse de nombreuses

---

<sup>1</sup>Pour des besoins de simplification, la photosynthèse sera décrite ici chez les organismes photosynthétiques eucaryotes. Chez les organismes photosynthétiques procaryotes, comme les cyanobactéries et les bactéries photosynthétiques, les événements primaires de la photosynthèse sont similaires, mais l'ensemble du processus s'effectue dans la membrane plasmique et dans le cytoplasme et non dans un organe spécialisé comme le chloroplaste.

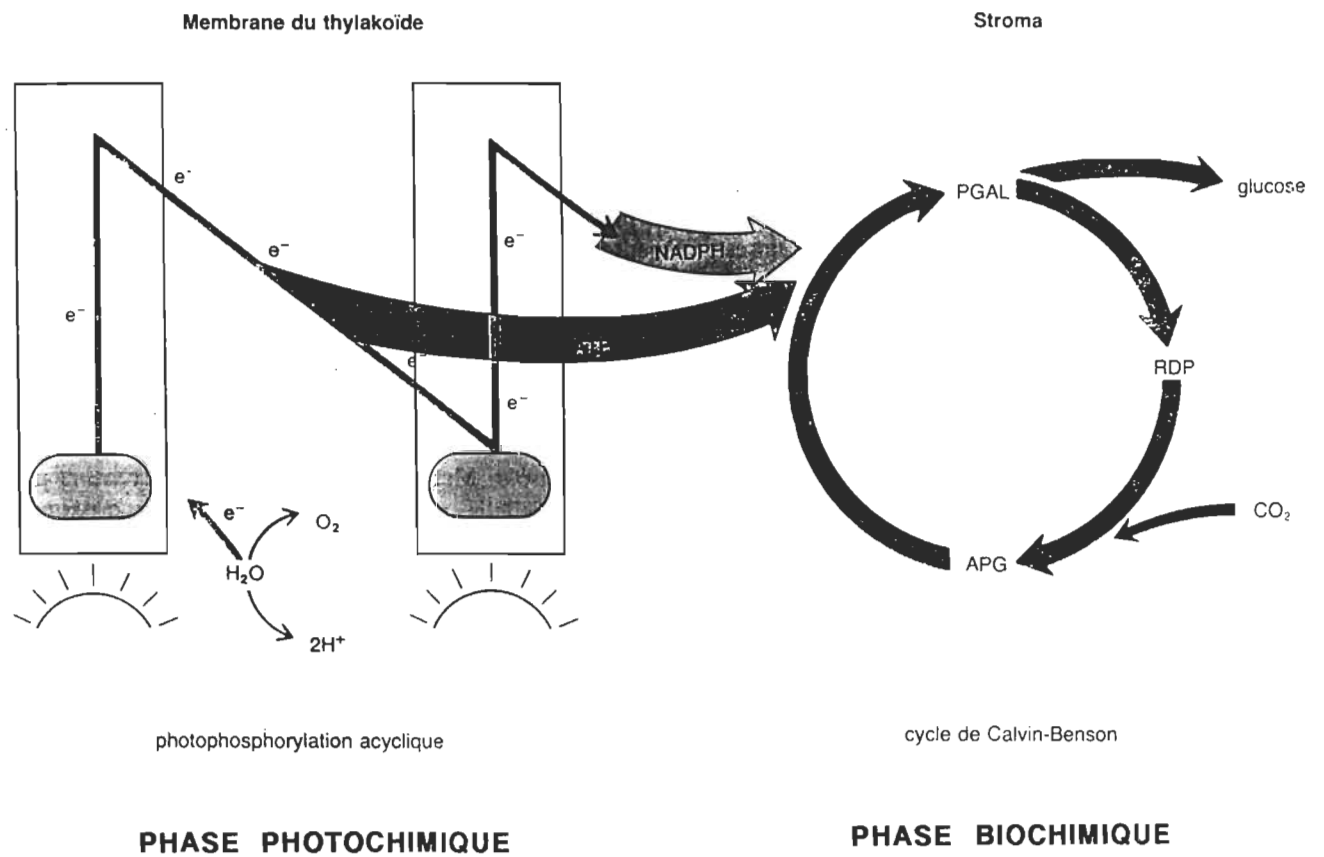


**Figure 1 .** Représentation schématique de la feuille, de la cellule végétale, du chloroplaste et des thylacoïdes. À gauche, en bas, on retrouve une photomicrographie de la région empilée des thylacoïdes (grana). (D'après Mader, 1989)

protéines du chloroplaste. Dans le stroma, baigne un important réseau interne de membranes nommées thylacoïdes (dérivé d'un mot grec signifiant "comme un sac vide"). Généralement, les thylacoïdes prennent la forme d'un ensemble de vésicules empilées nommées grana, reliées entre elles par des membranes non empilées nommées lamelles stromatiques. L'espace interne continu et délimité par la membrane des thylacoïdes se nomme lumen, et présente un contenu différent et un pH inférieur à celui du stroma. (D'après Salisbury et Ross, 1992 et Hooper, 1984). Cette grande compartimentation du chloroplaste, est le reflet d'une haute organisation fonctionnelle, comme nous le verrons.

#### **1.1.2.2 - Organisation fonctionnelle du chloroplaste**

L'ensemble des événements photosynthétiques ont lieu soit dans le stroma, soit dans les membranes des thylacoïdes. Dans les thylacoïdes surviennent les réactions traditionnellement dites " de la phase lumineuse", qui conduiront, en présence de lumière à la production d'oxygène et à la formation de composés hautement réduits l'ATP et le NADPH. On utilise maintenant les termes: phase physicochimique ou photochimique pour qualifier cette phase (Campbell et Mathieu, 1995). Ces deux substrats (l'ATP et le NADPH) serviront par la suite, dans le stroma, à la fixation du  $\text{CO}_2$ , dans un ensemble complexe de réactions connues sous le nom de cycle de Calvin-Benson (figure 2) qui conduisent à la formation d'hydrates de carbone et d'autres composés organiques. Cette phase auparavant nommée phase sombre est maintenant appelée phase biochimique (Campbell et Mathieu, 1995). Le présent projet, concerne les réactions de la phase photochimique survenant au niveau du PS II, un complexe multiprotéique situé dans la membrane du thylacoïde. Avant d'aborder en détail l'organisation structurelle et fonctionnelle du PS II, une vue d'ensemble du thylacoïde, de sa composition et des réactions qui y surviennent s'impose.



**Figure 2.** Schématisation de la photosynthèse. Le lien entre la phase photochimique et la phase biochimique est représenté (D'après Mader, 1989).

### 1.1.3-Les thylacoïdes

#### 1.1.3.1- Organisation structurelle des thylacoïdes

Les thylacoïdes ont une composition lipidique particulière. Ils ne contiennent que 4 % de phospholipides (PG,PC) et sont majoritairement composés de galactolipides dont le MGDG (59%), le DGDG (27%) et le SQDG (10%) (Murata et coll., 1990; Fragata et coll., 1994). La chaîne acyl de ces lipides a un haut degré d'insaturation, ce qui confère à la membrane du thylacoïde une grande fluidité. Ces lipides constituent 25 à 35% (p/p) de la masse des membranes thylacoïdiennes chez les plantes supérieures, le reste étant composé d'autres lipides, les pigments et de protéines (Murphy, 1986). Cette membrane présente un degré exceptionnel d'organisation, on peut y distinguer trois types d'unités fonctionnelles auxquelles correspondent des entités biochimiques distinctes (voir la figure 3) (Albertsson, 1987; Anderson et Andersson, 1988; Olive et Vallon, 1991):

i- Les photosystèmes (PS) I et II sont des complexes pigments-protéines constitués d'un complexe collecteur de lumière (CCLI (LHC I) et CCLII (LHC II) respectivement) chargé de capter la lumière et de canaliser l'énergie radiante vers un centre réactionnel contenant une paire de chlorophylle spéciale (P680 et P700 respectivement), où il y aura séparation de charge et initiation d'un ensemble de réactions d'oxydoréduction.

ii- Des transporteurs d'électrons comme la plastoquinone, le complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f* (cyt *b<sub>6</sub>f*) et la plastocyanine, qui relient les deux photosystèmes dans une chaîne de transport d'électrons allant de l'eau jusqu'au NADP<sup>+</sup>.

iii- Une ATP synthétase qui utilisera le gradient de protons généré lors du transfert d'électrons, pour produire de l'ATP.

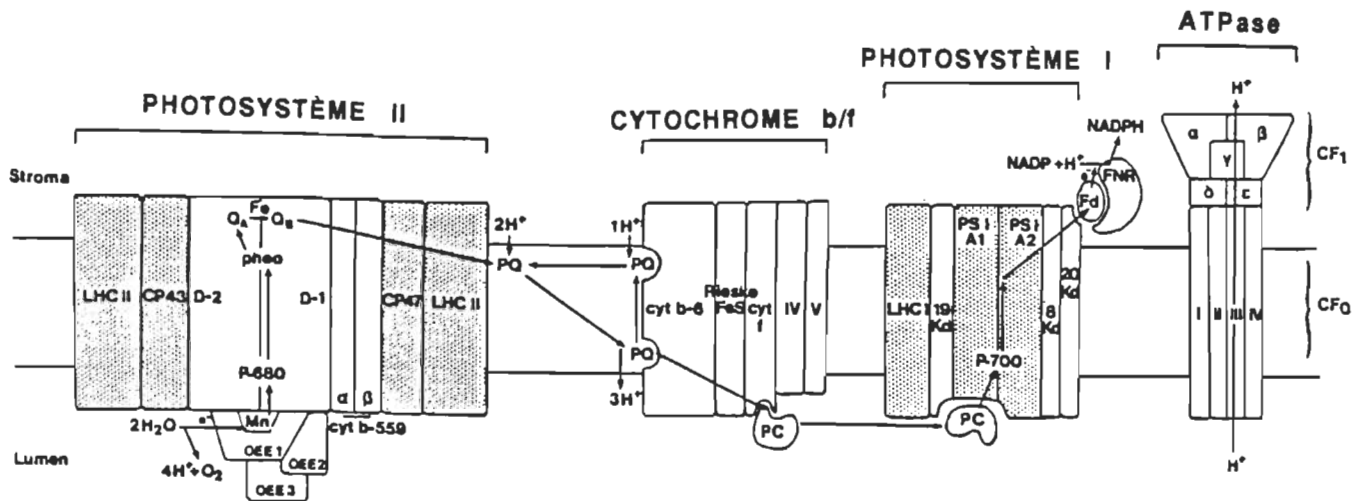


Figure 3. Organisation de la membrane du thylacoïde (D'après Olive et Vallon, 1991)

Le PS I, le PS II, le complexe *cyt b<sub>6</sub>/f* et l'ATP synthétase forment 4 grands complexes supramoléculaires distribués d'une façon hautement organisée dans la membrane. (Olive et Vallon, 1991; Anderson et Andersson, 1982; Murphy, 1986). En effet, on observe une grande hétérogénéité dans la distribution latérale des divers complexes de la membrane du thylacoïde. Les premières évidences expérimentales de cette asymétrie de distribution proviennent des expériences de fractionnement de la membrane où l'on récupérait l'activité associée au PS I et au PS II dans des fractions différentes suite à un traitement doux au détergent ou à un traitement mécanique. (Andersson et Åkerlund, 1978; Boardman et Anderson, 1964; Albertsson, 1987; Albertsson et coll., 1994). Par la suite, des études de marquage immunochimique et de cryodécapage suivies d'observations en microscopie



domaines distincts de la membrane (Olive et Vallon, 1991; Andreasson et coll., 1988; Anderson et Andersson, 1982 ). En fait, le PS I et l'ATP synthétase seraient presque exclusivement localisés dans les lamelles stromatiques, les PS II seraient principalement ( $\approx 80\%$ ) retrouvés dans les grana et les complexes cyt *b<sub>6</sub>f* seraient présents dans les deux régions caractéristiques (Olive et Vallon, 1991). Cette ségrégation des deux photosystèmes dans des domaines distincts occasionne d'importantes conséquences (Anderson, 1981), dont la nécessité d'avoir des transporteurs mobiles pour relier le PS II, le complexe cyt *b<sub>6</sub>f* et le PS I. La plastocyanine et la plastoquinone sont les candidates pour le transfert latéral des équivalents réducteurs. La plastoquinone est abondante et diffuse rapidement dans la bicouche lipidique (Whitmarsh, 1986). La diffusion latérale de la plastocyanine dans la lumière du thylacoïde a été confirmée par des méthodes immunochimiques (Haehnel, 1986).

Enfin, grâce à cette distribution asymétrique des divers complexes dans la membrane des thylacoïdes, il est possible d'obtenir des fragments membranaires riches en PS II qui, comme mentionné précédemment, sont principalement localisés dans les thylacoïdes empilés. En effet, par des méthodes mécaniques ou par un traitement doux au détergent suivi de centrifugations différentielles, il est possible de séparer les thylacoïdes granaires des thylacoïdes stromatiques (Albertsson et coll., 1994). La première procédure au détergent, a été mise au point par Berthold, Babcock et Yocum (1981) d'où le nom de préparation BBY. Cette préparation est membranaire, contient des PS II dans leur environnement lipidique natif et encore associés à leur antenne. Cette préparation présente une combinaison unique de pureté, de rendement et de transport d'électrons élevé et elle est encore largement utilisée pour des études de caractérisation du PS II (Dunahay et coll., 1984). On doit beaucoup des connaissances actuelles sur le PS II à ce type de préparation et à d'autres plus raffinées qui ont vu le jour dans les dernières années et qui ont conduit à l'obtention d'extraits enrichis en centres réactionnels du PS II (Andersson et Styring, 1991).

### 1.1.3.2 - Organisation fonctionnelle des thylacoïdes

L'ensemble des événements membranaires qui conduiront à la transformation de l'énergie solaire radiante en énergie chimique (NADPH et ATP) peut se résumer ainsi (voir la figure 3):

Au niveau du PS II, la lumière est d'abord captée par un complexe collecteur de lumière périphérique et les excitons sont canalisés vers le centre réactionnel. Très rapidement, le donneur primaire P680 sera excité et cédera son électron à l'accepteur intermédiaire d'électron phéophytine. L'électron perdu par P680 sera récupéré en provenance de l'eau; des ions  $H^+$  et de l'oxygène seront produits selon un mécanisme de photooxydation que nous détaillerons dans la prochaine section. L'électron capté par la phéophytine sera ensuite transféré lors d'une série d'étapes rapides jusqu'à une plastoquinone Qb, un transporteur mobile et liposoluble. Il y a un bassin de plastoquinone dans la membrane. La quinone accepte deux électrons en provenance du PS II et deux protons en provenance du stroma. Chaque quinone réduite ( $PQH_2$ ) est oxydée par le complexe cyt *b<sub>6</sub>f* et deux protons sont relargués dans le lumen. Ensuite, les électrons du complexe cyt *b<sub>6</sub>f*, réduisent la plastocyanine et sont transférés du côté oxydant du PS I. Au PS I, la paire de chlorophylle spéciale (P700) est excitée en présence de lumière et cède un électron à un accepteur adjacent Ao; les électrons en provenance de la plastocyanine réduisent la chlorophylle oxydée. L'électron qui a été extrait de P700, est amené via une série de transporteurs d'électrons jusqu'au  $NADP^+$  pour former le NADPH (ou au cyt *b<sub>6</sub>f* pour la première étape de la photophosphorylation cyclique). Enfin, le gradient de protons formé au cours du processus, sera utilisé par l'ATP synthétase pour générer de l'ATP (D'après Bogorad, 1991; Hader et Tevini, 1987 ).

Ceci n'est qu'un survol sommaire de ce processus complexe qu'est la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Les événements survenant au niveau du PS II ainsi que les composantes impliquées, seront maintenant présentés en détail.

## **1.2 - Le photosystème II**

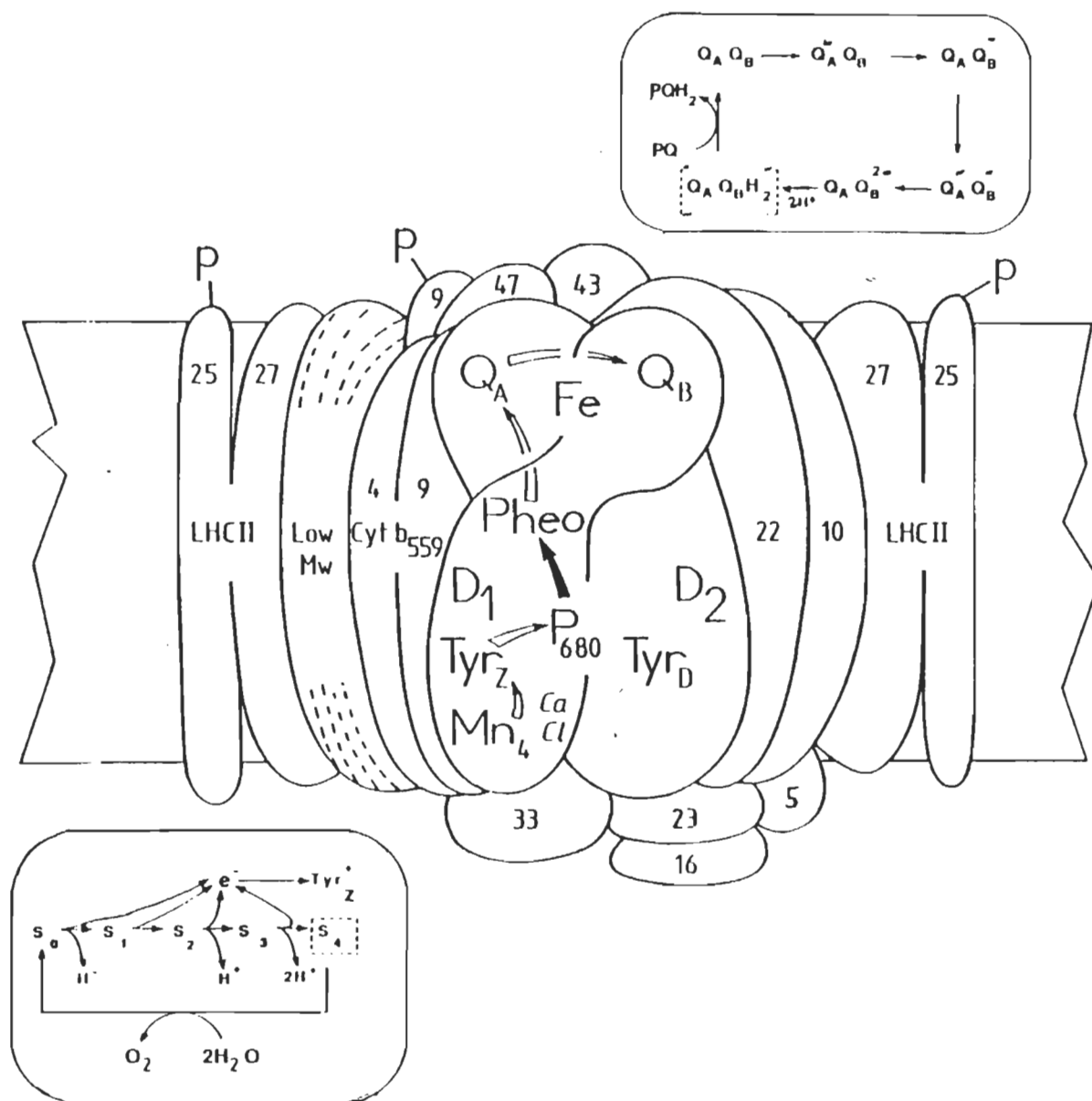
### **1.2.1- Généralités**

Au cours des dernières années, les connaissances sur le fonctionnement et la structure du PS II ont rapidement progressé. Grâce à des efforts concertés dans des disciplines aussi variées que la biophysique, la biochimie ou la génétique moléculaire, le PS II est devenu parmi les complexes "multiprotéiques" membranaires le mieux caractérisé en biologie. Cependant, malgré ce "titre de noblesse", il reste encore beaucoup à élucider pour une compréhension claire et définitive du fonctionnement du PS II et ça demeure un défi majeur de la recherche actuelle en bioénergétique. Non seulement le PS II remplit des fonctions aussi complexes que la capture de la lumière, la séparation de charge, il possède aussi l'unique capacité de photooxyder l'eau pour produire l'oxygène que nous respirons. De plus, le PS II est la cible de nombreux inhibiteurs de la photosynthèse et est le site d'importants mécanismes d'adaptation et de protection (Andersson et Styring, 1991). Dans cette section, nous tenterons de rendre compte de l'état actuel des connaissances et des "ignorances" sur ce fascinant complexe enzymatique.

### 1.2.2- Organisation structurelle du photosystème II

Le PS II est un complexe multiprotéique contenant jusqu'à 20 polypeptides différents (figure 4, tableau 1). D'une façon assez surprenante, seulement deux polypeptides (D1 et D2) portent toutes les composantes redox impliquées dans la photochimie primaire et dans la photooxydation de l'eau. Au moins 7 protéines sont impliquées dans l'absorption de lumière et au moins 14 sous-unités ont des fonctions encore obscures. Même si ces sous-unités n'ont pas de fonction catalytique dans le sens classique, elles jouent probablement un rôle dans la régulation du transfert d'électrons et/ou dans le maintien de l'organisation structurelle du PS II. Un des défis de la recherche sur le PS II, sera justement d'élucider le rôle de ces protéines "accessoires" (Andersson et Styring, 1991).

Le PS II est le produit de deux génomes, il contient des sous-unités codées dans le noyau et d'autres codées dans le chloroplaste. Pour la majorité des polypeptides les gènes ont été clonés et séquencés (Hermann et coll., 1984; Bricker, 1990; Wolfe, 1991; Erickson et Rochaix, 1992). Même si la structure primaire de chacune des protéines du PS II est connue, il reste encore beaucoup à connaître de l'assemblage et de l'orientation de chacune des protéines dans la membrane, et de l'interaction entre ces protéines dans le complexe assemblé (Bohnert et Jensen, 1991).



**Figure 4.** Organisation structurale du photosystème II. L'encadré inférieur gauche représente le cycle des états S survenant au cours du processus de photooxydation de l'eau. L'encadré supérieur droit illustre le processus de réduction et de protonation de la quinone Q<sub>b</sub>. (D'après Andersson et Styring, 1991).

Tableau 1

## Polypeptides du photosystème II

PROTÉINE poids moléc. (kDa)	GENE (c ou n) <sup>1</sup>	FONCTION PROPOSÉE	ORGANISATION (Intrinsèque ou extrinsèque.)
D1 (32)	psbA (c)	Centre réactionnel Liaison du Mn ?	Intrinsèque
D2 (32)	psbD (c)	Centre réactionnel	Intrinsèque
Cytochrome <i>b559</i> (9)	psbE (c)	Transport d'électron parallèle? et/ou	Intrinsèque
Cytochrome <i>b559</i> (4)	psbF (c)	Protection contre photoinhibition?	Intrinsèque
CP47	psbB (c)	Antenne proximale	Intrinsèque
CP43	psbC (c)	Antenne proximale	Intrinsèque
Phosphoprotéine (9)	psbH (c)	Régulation?	Intrinsèque
PE33	psbO (n)	Stabilisation du Mn Affinité Ca <sup>2+</sup> /Cl <sup>-</sup>	Extrinsèque
PE23	psbP (n)	Affinité Ca <sup>2+</sup> /Cl <sup>-</sup>	Extrinsèque
PE16	psbQ (n)	Affinité Ca <sup>2+</sup> /Cl <sup>-</sup>	Extrinsèque
22	psbS (n)	Régulation? Structure?	Intrinsèque
10	psbH (c)	Structure?	Intrinsèque
5	psbT (n)	?	Extrinsèque
CCLII (27)	Lhcb 1 (n)	Antenne distale	Intrinsèque
CCLII(25)	Lhcb 2 (n)	Antenne distale	Intrinsèque
CP29 (29)	Lhcb 4 (n)	Antenne distale	Intrinsèque
CP26 (26)	Lhcb 5 (n)	Antenne distale	Intrinsèque
CP24 (24)	Lhcb 6 (n)	Antenne distale	Intrinsèque

<sup>1</sup> c: origine chloroplastique ou n: origine nucléaire

Les points d'interrogation (?) indiquent une incertitude ou une controverse dans la littérature.  
D'après Ghanotakis et Yocum, 1990; Andersson et Styring, 1991; Barber, 1994; Hobe et coll. 1995)

### 1.2.2.1- Les polypeptides du PS II:

#### a) D1/D2 - Le centre réactionnel

Par analogie avec les protéines L et M du centre réactionnel de la bactérie pourpre (Deisenhofer et coll., 1985; Deisenhofer et Michel, 1989), il est maintenant généralement accepté que le centre réactionnel du PS II est organisé en hétérodimère. Les deux protéines impliquées, désignées sous le nom de D1 et D2, portent l'ensemble des composantes redox requises pour les réactions photochimiques primaires (**figure 4, tableau 2**) (Svensson et coll., 1990). Un ensemble de méthodes spectroscopiques a été utilisé pour déterminer la nature et la position relative des composantes du transfert d'électrons. Ces analyses ont montré qu'elles sont organisées d'une façon vectorielle, les accepteurs Qa et Qb étant sur la face stromatique et P680 près de la face luminale (Witt, 1987; Wydrzinski, 1990). Les protéines D1 et D2 sont des protéines ayant chacune cinq segments transmembranaires. Par analogie avec le centre réactionnel bactérien, par des études de mutation dirigée (Diner et coll., 1991; Vermaas, 1993; voir Debus, 1992 pour une revue détaillée des études de mutation) et par des études de modification chimique (Debus, 1992), on a réussi à assigner certains résidus d'acide aminé comme ligands probables de certaines composantes redox. Par exemple, on a suggéré que P680 se lie à l'histidine 198 des polypeptides D1 et D2, et que la phéophytine se lie à la glutamine 130 de D1 (Andersson et Styring, 1991). On a montré que le résidu Tyrosine-161 sur D1 (Tyr<sub>z</sub>) était le donneur immédiat d'électrons à P680 (Debus et coll., 1988ab; Vermaas et coll., 1988 et Metz et coll., 1989). Qa et Qb se lient respectivement aux polypeptides D2 et D1, les résidus d'acide aminé impliqués n'ont pas encore été identifiés. Enfin, la localisation exacte du manganèse n'est pas connue et fait l'objet de nombreux travaux, mais il est clair que les manganèses fonctionnellement actifs sont situés sur la face luminale de la membrane, probablement dans un compartiment restreint

(Miller et Cox, 1984) formé entre le centre réactionnel D1/D2 et la protéine extrinsèque de 33 kDa. Seibert et coll. (1989) ont proposé que des résidus histidines et des résidus carboxylés coordinent un ou des manganèse du PS II (pour plus de détails sur le manganèse, voir la section 1.2.3.2 ).

**Tableau 2**  
**Cofacteurs associés au photosystème II**

COFACTEUR	STOIECHIO- MÉTRIE	FONCTION	LIGAND(S) PROPOSÉS
Mn	4?	Oxydation de l'eau (A)	?(47,43,33,D1,D2)
Ca <sup>2+</sup>	2-3?	Maintien de la structure Régulation de A	?(47,43,33,D1,D2,23)
Cl <sup>-</sup>	4-5?	Maintien de la structure Régulation de A Stabilisation des charges	?(47,43,33, D1,D2,23)
PQ respectivement	2	Accepteurs d'électrons (Qa et Qb)	D2 et D1
Chl <i>a</i>	50	Photochimie/antenne proximale	47,43,D1,D2
Phéophytine <i>a</i>	2	Séparation de charge	D1 et D2
Tyr <sub>Z</sub>	1	Oxydation du Mn Réduction de P680	D1
Tyr <sub>D</sub>	1	Oxydation de S <sub>0</sub> à S <sub>1</sub>	D2
Fe non-heme	1	Regulation du transfert d'électrons de Qa à Qb	D1, D2
Hème Fe	2(b559)	?	9, 4.5 kDa

D'après Andersson et Styring, 1991 et Ghanotakis et Yocum, 1990.

Les points d'interrogation (?) indiquent une incertitude ou une controverse dans la littérature.



### b) Cytochrome *b559*

Bien que le cyt *b559* soit une des premières protéines étroitement associées au PS II, sa fonction précise demeure inconnue. Par contre, l'intérêt pour ce cytochrome est grandissant étant donné sa présence dans les particules de centre réactionnel (Nanba et Satoh, 1987). Il y a tout de même un consensus à savoir que le cyt *b559* n'est pas impliqué dans le transport linéaire d'électrons au PS II. Cependant, Falkowski et coll. (1986) ont suggéré qu'il prenne part à un transport d'électrons cyclique autour du PS II, Cramer et coll. (1990) suggèrent qu'il soit impliqué dans la désaturation des lipides et enfin, Thompson et Brudvig (1988) lui ont proposé un rôle dans la photoprotection. Bien qu'on connaisse peu la fonction du cyt *b559*, on en sait plus sur son organisation dans la membrane thylacoïdienne (Tae et coll., 1988; Cramer et coll., 1990). Le cytochrome est composé de deux polypeptides, une sous-unité  $\alpha$  de 9 kDa et une sous-unité  $\beta$  de 4 kDa. Chaque polypeptide présente un segment transmembranaire et chaque segment porte une histidine liant la portion hème du cytochrome pour former ainsi l'hétérodimère.

### c) Les polypeptides extrinsèques de 33, 23 et 16 kDa (PE33, PE23 et PE16)

L'expérimentation sur des membranes de thylacoïdes inversées et sur des fragments membranaires riches en PS II ont permis le relargage de polypeptides extrinsèques situés sur la face luminale du thylacoïde (Andersson et Åkerlund, 1987; Murata et Miyao, 1985). Des expériences d'extraction et de reconstitution ont permis de démontrer que ces trois polypeptides participent dans les réactions de photooxydation de l'eau (voir section 1.2.3.1) et forment avec le manganèse et probablement en association avec des composantes intrinsèques du PS II (D1/D2, cyt *b559*, CP47 et CP43), ce que plusieurs auteurs ont appelé le complexe de dégagement d'oxygène (Murata et Miyao, 1985; Andersson, 1986,

Andersson et Åkerlund, 1987). Cependant aucun de ces polypeptides ne porte de composante redox, ni ne contient de manganèse. Ces trois protéines hydrophiles sont présentes en quantité équimolaire, mais il existe une certaine controverse quant à la stoechiométrie. En effet, selon les auteurs, on propose une copie (Murata et coll., 1984; Enami et coll., 1992; Enami et coll., 1991) ou deux (Xu et Bricker, 1992; Millner et coll., 1987) de chacun des polypeptides par PS II.

La liaison de ces trois polypeptides à la surface interne de la membrane est de nature électrostatique, mais peut aussi impliquer des liens hydrogènes pour PE33 étant donné que ce dernier pour être détaché nécessite des traitements de fortes concentrations en sels et/ou des traitements à pH élevé (Andersson et Åkerlund, 1987). L'ensemble des liens existant entre les divers polypeptides a fait l'objet de nombreuses études et ne demeure que partiellement élucidé. Des études de reconstitution membranaire (Miyao et Murata, 1983a, 1983b, 1984a, 1984b, 1989; Kuwabara et coll., 1985; Eaton-Rye et Murata, 1989; pour une revue voir Miyao et Murata, 1989) ont montré que la présence de PE33 est essentielle pour une liaison adéquate de PE23 au PS II; ainsi que la présence de PE33 et PE23 est essentielle pour la liaison de PE16. Ces études ont conduit à la suggestion que les trois polypeptides extrinsèques sont probablement liés entre eux d'une façon successive, PE16 se liant à PE23, PE23 à PE33 et enfin PE33 à une ou des composantes intrinsèques. De plus, des études de pontage (Bowlby et Frasch, 1986; Machold, 1986; Milner et coll., 1987; Enami et coll., 1987, 1989, 1990, 1991, 1992), de digestion à l'aide de protéases (Isogai, Yamamoto et Nishimura, 1985) et des études immunologiques (Ljungberg et coll., 1984, Ivey et Berg, 1985, Aoki et coll., 1986, Camm et coll., 1987) ont montré que PE33 peut se lier directement au centre réactionnel formé par D1/D2 et aux antennes proximales CP47 et CP43. Les deux autres polypeptides PE23 et PE16 formeraient un genre d'écran entre PE33 et le lumen. Des sites supplémentaires pour la liaison de PE23 ont été suggérés sur les antennes

distales du PS II et sur le polypeptide de 10 kDa. Enfin, très peu de données sont disponibles quant aux résidus d'acide aminé impliqués dans les interactions de liaison entre les protéines (Ghanotakis et Yocum, 1990). Une étude très intéressante a montré que les cystéines de PE33 forment un pont disulfure, qui lorsque réduit empêche la liaison du polypeptide à son site (Tanaka et Wada, 1988).

Le rôle précis de chacun des polypeptides extrinsèques dans le processus de photooxydation de l'eau demeure encore obscur. Leur fonction "non-catalytique" a été largement reconnue lorsqu'on a observé que l'activité de transport d'électron perdue lors de l'enlèvement des polypeptides pouvaient être restaurée par l'addition d'ions calcium et/ou chlorure (Andersson et coll., 1984; Ghanotakis, et coll., 1984a; Miyao et Murata, 1984a; Nakatani et coll., 1984; Ono et Inoue, 1984). Il fut alors proposé que les polypeptides extrinsèques étaient essentiels pour la liaison de ces ions au site de photooxydation de l'eau (Murata et Miyao, 1985; Andersson et Åkerlund, 1987). Ils pourraient fournir des sites de liaison pour les cofacteurs, mais on pense plutôt qu'ils formeraient une sorte d'enclave favorisant la liaison des cofacteurs à des sites intrinsèques ou tout simplement favorisant la concentration des cofacteurs près du centre catalytique (Vermass, 1993). De plus, PE33, appelé aussi "manganese stabilizing protein" (MSP), jouerait un rôle important dans la stabilisation d'au moins deux manganèses et maintiendrait le complexe dans une configuration optimale pour la photooxydation de l'eau (Debus, 1992). PE33 semble être une protéine clé pour le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle du PS II comparativement à PE23 et PE16 étant donné que ces dernières ne sont pas retrouvées chez les cyanobactéries (Vermass, 1993).

Enfin, Hansson et Wydrzynski (1990) proposent que ces trois polypeptides forment une sorte de barrière entre le manganèse et la phase aqueuse. Ils pourraient en partie servir d'unité

régulatrice en contrôlant l'échange entre les réactifs et le site de manganèse au cours du processus de photooxydation de l'eau. Il est important que l'eau réagisse à l'étape appropriée au cours du processus pour éviter la production d'espèces intermédiaires potentiellement destructrices, comme le  $H_2O_2$ . De plus, cette "barrière" que forme les polypeptides extrinsèques pourrait servir de protection pour le centre catalytique contre les agents exogènes, comme par exemple des polluants (Rutherford, 1989).

Même si leurs fonctions respectives demeurent encore largement spéculatives, nul doute que ces trois polypeptides sont d'une importance capitale pour le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle du PS II.

#### d) L'antenne proximale: CP47 et CP43

Ces deux polypeptides associés au cœur du PS II lient la chlorophylle *a* et jouent donc un rôle dans l'absorption de la lumière et le transfert de l'énergie vers le centre réactionnel. On les appelle antennes proximales parce qu'elles sont étroitement associées au cœur du PS II, par comparaison aux complexes collecteurs de lumière qui sont situés en périphérie du PS II (Voir Bassi et coll., 1990 pour une excellente revue). Ces polypeptides ont chacun 6 segments transmembranaires (Gray et coll., 1989). Ces deux polypeptides possèdent un large domaine hydrophile d'environ 200 acides aminés exposés du côté luminal du thylacoïde. Ce qui a conduit certains auteurs à suggérer que ces polypeptides puissent être impliqués dans des fonctions autres que la capture de lumière. Morris et Herrmann (1984) ont proposé que ce segment hydrophile soit impliqué dans la liaison des polypeptides extrinsèques et du manganèse. Plus spécifiquement, Frankel et Bricker (1992) ont proposé que ce segment soit impliqué dans la liaison de PE33.

e) L'antenne distale: CCLII (27), CCLII(25), CP29, CP27, CP24

L'antenne distale contient des pigments accessoires grâce auxquels l'organisme photosynthétique peut élargir son spectre d'absorption et répondre dans diverses conditions d'intensité lumineuse et de distribution spectrale. Il s'agit d'un ensemble de protéines contenant de la chlorophylle *a* et *b* situées en périphérie du PS II (Voir Bassi et coll., 1990 pour une excellente revue; Külbrandt, 1994; Külbrandt et coll., 1994). Le complexe collecteur de lumière (CCLII) est la composante majeure de la membrane du thylacoïde, comprenant jusqu'à la moitié de sa chlorophylle et de sa masse protéique (Green, 1988; Külbrandt, 1994). Le CCLII est composé d'un polypeptide de 232 acides aminés, présentant deux isoformes de 27 et 25 kDa. Chaque isoforme présente trois segments transmembranaires et s'assemble sous forme de trimère, la forme fonctionnelle du complexe. Chaque monomère lie 12 Chl (7 Chl *a* et 5 Chl *b*), 2 caroténoïdes (les lutéïnes) ainsi que deux phospholipides différents PG et DGDG ((Külbrandt, 1994). Environ 30% des CCLII peuvent être phosphorylés dans des conditions correspondant à une surexcitation du PS II. Une partie des CCLII phosphorylés se dissociera du PS II et migrera des régions empilées vers les régions non-empilées de la membrane du thylacoïde, en fait jusqu'au PS I, pour ainsi augmenter sa capacité d'absorption lumineuse (Briantais, 1986; Allen, 1992). En plus de cette importante fonction de distribution de l'énergie entre les deux photosystèmes, le CCLII serait impliqué dans le phénomène d'empilement des thylacoïdes, dans le maintien de l'organisation structurale du PS II et dans la photoprotection (Staehlin, 1986; Anderson et Andersson, 1988; Külbrandt et coll., 1994).

D'autres complexes chlorophylle-protéine, moins abondants, sont associées à l'antenne distale du PS II: CP29, CP26 et CP24. Ces complexes seraient aussi associées aux antennes proximales et au centre réactionnel et pourraient servir de lien ou d'ancrage entre le CCLII et le centre réactionnel (Andersson et Styring, 1991; Külbrandt, 1994). Bassi et coll. (1987) et Miller et Carpentier (1992) ont suggéré que ces protéines jouent un rôle dans

la dissipation de l'énergie provenant du centre réactionnel dans le but d'éviter la photoinhibition.

f) 10 et 22 kDa:

La fonction de ces deux polypeptides intrinsèques demeure inconnue. Lorsqu'ils sont délogés de la membrane, par de fortes concentrations de sels ou par du détergent, on peut restaurer l'activité de dégagement d'oxygène en ajoutant du calcium ou du chlorure. On leur suggère donc des fonctions régulatrices ou structurelles. Il existe certaines évidences que la protéine de 10 kDa offre un site de liaison au polypeptide extrinsèque de 23 kDa (Ljungberg et coll., 1986). Cependant, récemment, Mishra et Ghanotakis (1994) sont parvenus à extraire sélectivement les polypeptides CP29, CP26, 22 et 10 kDa tout en maintenant les polypeptides extrinsèques liés au PSII. Ce résultat rend douteuse la participation de ces polypeptides dans la liaison des polypeptides extrinsèques. Pour ce qui est du polypeptide de 22 kDa, on propose qu'il joue un rôle régulateur sur le côté accepteur du PS II (Henrysson et coll., 1987; Ghanotakis et coll., 1987). De plus, Kim, Pichersky et Yocum (1995) ont récemment montré qu'il est localisé entre le CCLII et le centre réactionnel et ont suggéré qu'il puisse servir de lien entre les deux complexes. Dans le même sens, Funk et coll. (1994) ont montré que ce polypeptide lie la chlorophylle et ont suggéré qu'il puisse jouer un rôle dans la "collection" de lumière.

g- Autres polypeptides

Un ensemble de polypeptides de faible poids moléculaire entre 3 et 7 kDa ont été détectés sur divers types de préparations de PS II, grâce au raffinement des méthodes d'électrophorèse (Andersson et Styring, 1991). La majorité de ces polypeptides sont intrinsèques ("faible p.m." sur la figure 4 ) et leur fonction respective demeure énigmatique. Parmi ceux-ci, un petit polypeptide de 4.5 kDa (gène PSBI) a été retrouvé dans des préparations de centres réactionnels isolés (Ikeuchi et Inoue, 1988; Webber et coll., 1989). Ce petit polypeptide joue probablement un rôle important dans la fonction du PS II.



### 1.2.3 - L'organisation fonctionnelle du PS II

Le PS II peut être considéré comme la partie de l'appareil photosynthétique qui catalyse le transfert des électrons, de l'eau jusqu'à la plastoquinone sous l'action de la lumière, c'est-à-dire:



d'où son appellation, selon certains auteurs, de "eau/plastoquinone oxydoréductase" (Andersson et Styring, 1991; Hansson et Wydrzinski, 1990). Les indices *s* et *l* indiquent respectivement le côté stromatique et luminal de la membrane du thylacoïde, soulignant la nature vectorielle du processus.

La réduction de la plastoquinone en plastoquinol est un processus impliquant deux électrons, alors que l'oxydation de deux molécules d'eau est un processus nécessitant l'abstraction de quatre électrons. Alors, le PS II possède un mécanisme permettant l'accumulation de deux équivalents réducteurs sur le côté accepteur<sup>2</sup> du PS II et de quatre équivalents oxydants sur le côté donneur<sup>3</sup> du PS II, le mécanisme est initié par la séparation de charge qui elle est une réaction impliquant un électron à la fois. Pour accomplir cette électrochimie complexe, le PS II contient un réseau de composantes redox, liées aux protéines, qui sont organisées d'une façon vectorielle dans la membrane (figure 4, tableau 2).

---

<sup>2</sup> Le côté accepteur du PSII correspond aux composantes situées au-delà de P680, c'est-à-dire qui acceptent les électrons en provenance de P680.

<sup>3</sup> Le côté donneur du PSII fait référence aux composantes situées avant P680 dans la chaîne de transport d'électrons, et qui donnent donc les électrons à P680

L'ensemble du processus débute par l'absorption de la lumière par les antennes distales et proximales du PS II. L'énergie absorbée sera ultimement transférée à la paire de chlorophylle spéciale P680. L'énergie d'un seul photon favorise l'excitation de P680 à l'état singulet (P680\*). Très rapidement (3 ps approximativement), P680\* le donneur primaire d'électron réduira une phéophytine avoisinante formant ainsi l'espèce  $P680^+ \text{ Phéo}^-$ , ce qui résulte en une séparation de charge de part et d'autre de la membrane (pour une revue détaillée de ces événements, voir l'excellent manuscrit de Renger, 1992). Pour prévenir la recombinaison de ces charges, les espèces doivent être stabilisées. La charge négative portée par  $\text{Phéo}^-$  sera rapidement transférée à une plastoquinone  $Q_a$  et ensuite à une autre plastoquinone liée faiblement au site  $Q_b$  sur le côté accepteur du PS II. Sur le côté donneur du PS II,  $P680^+$  sera réduite en 20 à 200 ns par un résidu tyrosine ( $\text{Tyr}_Z$ ) situé à proximité sur la protéine D1. La  $\text{Tyr}_Z^+$  sera à son tour réduite par le complexe de dégagement d'oxygène (CDO) composé en son centre par un groupe de manganèse. La réduction de la  $\text{Tyr}_Z$  survient en 30  $\mu\text{s}$  à 1 ms dépendant de l'état d'oxydation du CDO. La **figure 5** illustre l'ensemble des transferts d'électrons survenant au niveau du PS II avec les temps de réaction correspondants.

Sur le côté accepteur, les électrons quitteront le site  $Q_b$  dans une série d'événements à deux électrons (voir encadré de droite à la figure 2). Avant qu'une recombinaison de charge entre  $Q_b^-$  et le complexe de dégagement d'oxygène ne survienne, une autre séparation de charge a lieu et  $Q_b$  sera réduit une seconde fois. Cette espèce doublement réduite ( $Q_b^{-2}$ ) sera protonnée, la plastohydroquinone réduite quittera le site  $Q_b$  et sera remplacée par une plastoquinone neutre en provenance du bassin de plastoquinone. Il est à noter que  $Q_b$  est le site d'action de nombreux herbicides commerciaux comme le DCMU. Ce dernier inhibe le transfert d'électrons entre  $Q_a$  et  $Q_b$  en compétitionnant avec la plastoquinone pour le site  $Q_b$  (Oettmeier, 1992).



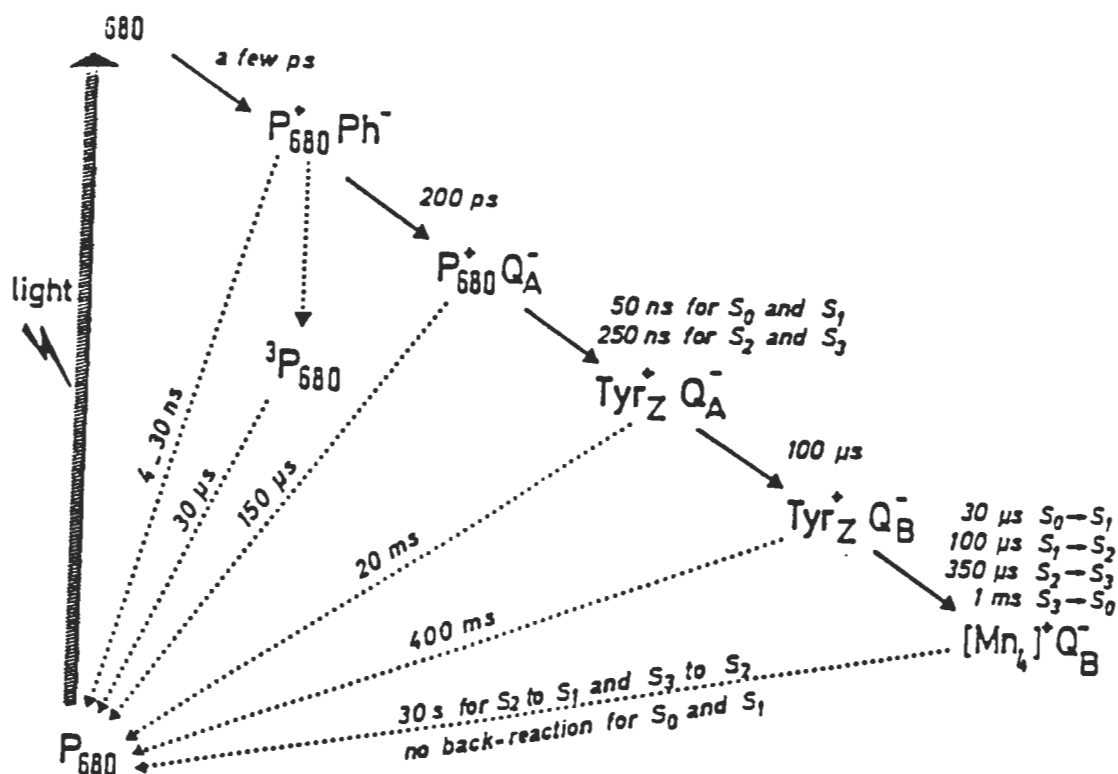


Figure 5. Transferts d'électrons survenant au niveau du photosystème II (D'après Rutherford, 1989)

Sur le côté donneur du PS II, la tyrosine Z oxydée ( $\text{TyrZ}^+$ ) récupérera ses électrons en provenance de l'eau. L'oxydation de l'eau nécessite que le complexe de dégagement d'oxygène accumule quatre équivalents oxydants selon un mécanisme que nous verrons maintenant plus en détail. Conséquemment, deux molécules de plastoquinones seront formées pour chaque molécule d' $\text{O}_2$  générées, un processus nécessitant quatre photons. (D'après Debus, 1992; Andersson et Styring, 1991).

### 1.2.3.1- Le mécanisme de photooxydation de l'eau

Le PS II possède l'unique capacité de cliver l'eau pour former de l'oxygène et des protons. Ce processus fournira des électrons à la Tyr<sub>Z</sub> oxydée et ultimement au pigment P680<sup>+</sup> pour le régénérer dans sa forme photoactive. La production d'oxygène est un processus impliquant quatre électrons. D'abord dans une expérience classique, Joliot (1969) a montré que la production d'oxygène présentait une périodicité d'ordre 4. En stimulant le PS II par des éclairs successifs, il observait que l'oxygène était dégagé à tous les quatre éclairs (avec un phénomène d'atténuation que nous ne détaillerons pas ici). En 1970, Kok et collaborateurs proposaient que chaque éclair est associé avec la production d'un équivalent oxydant que le PS II emmagasine (store) jusqu'à ce qu'un nombre suffisant (4) soit disponible pour oxyder l'eau. Selon cette hypothèse, le complexe producteur d'oxygène peut se présenter sous cinq formes transitoires, les états S (store); désignés S<sub>n</sub> où n correspond au nombre d'équivalent oxydant emmagasiné. L'oxydation de l'eau surviendrait au cours de la transition S<sub>4</sub> ----> S<sub>0</sub>. Cependant, la question à savoir où et quand l'eau se lie au site catalytique n'est pas encore résolue. De plus, au cours du processus, des protons sont aussi relargués selon la stoechiométrie 1,0,1,2 (Förster et Junge, 1985). Cependant, il n'a pu être déterminé si ces protons originent directement de l'eau ou de tout autre intermédiaire comme la matrice protéique (Andersson et Åkerlund, 1987). L'encadré de gauche sur la figure 4 illustre le cycle des états S (Joliot et Kok, 1975). Ce modèle est largement accepté et constitue la base d'un nombre imposant d'investigations destinées à déterminer à quelle réalité chimique correspondent chacun des états.

### 1.2.3.2- Le manganèse

On sait depuis longtemps que le processus de photooxydation de l'eau requiert du manganèse. Ce métal présente plusieurs états d'oxydation relativement stables compris entre +2 et +7, ce qui en fait un candidat idéal pour l'accumulation de charges au cours du processus de photooxydation de l'eau. Et en effet, lors d'une perturbation ou de l'enlèvement du manganèse par divers traitements, la réduction de la Tyr<sub>Z</sub> et le cycle des états S sont modifiés voire perdus (Amesz, 1983 et Babcock, 1987). Malgré un nombre imposant d'études, la localisation exacte du manganèse et son fonctionnement dans le PS II font l'objet d'un débat considérable. Il est tout de même généralement admis que:

- i- Stoechiométriquement, 4 manganèses sont associés au PS II. Malgré qu'une étude récente (Pauly et Witt, 1992) a déterminé une stoechiométrie de 6 Mn par centre producteur d'oxygène.
  - ii- Certains des ions Mn sont organisés dans un complexe multinucléaire.
  - iii- Que les états d'oxydation du manganèse sont associés aux transitions des états S.
  - iv- Que les ions Mn sont localisés dans un compartiment restreint faisant face au lumen.
- (d'après Hansson et Wydrzinski, 1990; Debus, 1992 et Mathis et Rutherford, 1994)

Grâce à un ensemble d'études spectroscopiques (RMN, EPR, EXAFS, XANES) on a pu en effet démontrer que l'état d'oxydation du manganèse change avec les divers états S, mais les configurations chimiques et électroniques exactes de ces états sont aujourd'hui encore incertaines. La figure 6 illustre certains des modèles proposés. Il est à noter que dans certains modèles, une histidine serait impliquée dans l'accumulation de charge, phénomène rare en biologie (Rutherford, 1989; Brudvig, Thorp et Crabtree, 1991; Tang et coll., 1994).

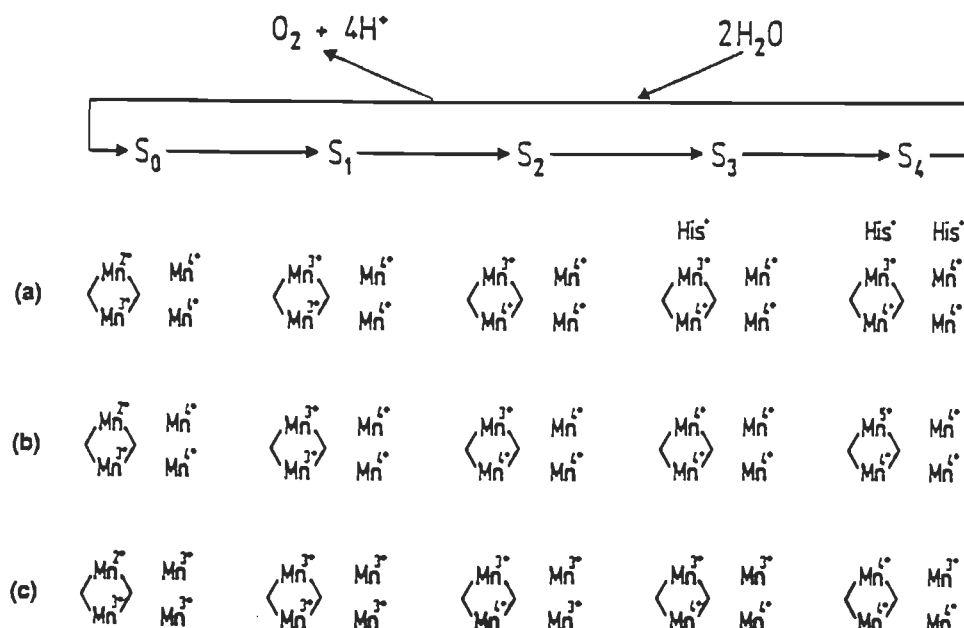


Figure 6. Exemples de modèles illustrant les états redox du manganèse au cours du cycle des états S (D'après Rutherford, 1989).

L'identité de la ou des protéines liant le manganèse demeure encore un problème central non résolu de la recherche en bioénergétique. La préparation minimale capable de produire de l'oxygène est composée des polypeptides D1, D2, cyt *b559*, CP47, CP43 et du polypeptide extrinsèque de 33 kDa. Alors le ou les sites de liaison du manganèse doivent être recherchés sur une ou plusieurs de ces sous-unités. Comme mentionné précédemment, le manganèse se retrouve probablement dans un compartiment restreint formé entre le centre réactionnel D1/D2 et la protéine extrinsèque de 33 kDa (Hansson et Wydrzinski, 1990). On a accumulé de plus en plus d'évidences expérimentales montrant que le polypeptide D1 puisse lier le manganèse. Debus (1992) en fait une revue exhaustive et les résidus d'acide aminé candidats sont les suivants: Asp-59, Asp-61, Glu-65, Asp-170, His-332, His-337, Asp-342 et Ala-344. Des données spectroscopiques détaillées sont fournies pour l'Asp-170 (Nixon et Diner, 1992). Par ailleurs, les modèles construits à partir des données obtenues en spectroscopie, situent le manganèse à proximité de la Tyr<sub>Z</sub> (Svensson et coll., 1990;

Andersson et Styring, 1991). De plus, il semble qu'une glutamine (glu-69) sur le polypeptide D2 soit un ligand potentiel du manganèse (Vermass et coll., 1990). Enfin, il faut noter que si on assume six ligands pour chacun des quatre manganèses, 12 ligands pourraient être fournis par le complexe de manganèse et 12 autres devront être fourni autour du complexe soit par des résidus d'acide aminé, soit par l'eau ou par les chlorures. D'autres polypeptides intrinsèques comme CP47 et CP43 portent de nombreux résidus acides situés sur la région exposée au lumen qui pourraient servir de ligand soit pour le manganèse ou pour le calcium (Debus, 1992; Vermass, 1993; Andersson et Styring, 1991). En ce qui concerne le polypeptide extrinsèque de 33 kDa, ce polypeptide peut être délogé de son site sans que le Mn ne soit extrait de la membrane. On pense donc que ce polypeptide ne lie pas le manganèse, mais plutôt qu'il protège et stabilise le complexe de manganèse (Debus, 1992; Vermass, 1993). Un nombre imposant d'études de mutation sont en cours pour tenter de déterminer les ligands du manganèse.

### **1.2.3.3 - Le calcium et le chlorure:**

Un enzyme complexe comme le PS II est régulé par un ensemble de facteurs et plusieurs ligands se lient directement ou indirectement au centre catalytique (le complexe de manganèse) ou à proximité pour moduler son action. Les deux cofacteurs les plus importants sont le calcium et le chlorure (**figure 4**). Si leur implication dans le processus de photooxydation de l'eau ne fait plus aucun doute, par contre, leur(s) fonction(s) précise(s) et leur(s) site(s) de liaison font encore l'objet d'une grande controverse (Boussac et Rutherford, 1994).

### a) Le chlorure

L'implication du chlorure dans le processus de photooxydation de l'eau a été suggérée très tôt par Bove et coll. (1963) et Izawa et coll. (1969) et est bien établie (Critchley, 1985). En fait l'enlèvement du chlorure par divers traitements (dilution, pH alcalin, températures élevées, sulfates, découpleurs) inhibe le dégagement d'oxygène. Theg, Jursinic et Homann (1984) ont montré que le cycle des états S est interrompu dans ces conditions. En fait, la transition  $S_2 \rightarrow S_3$  est interrompue. Des observations plus récentes montrent que le cycle est plutôt interrompu entre  $S_3$  et  $S_0$  (Boussac et Rutherford, 1994). L'activité peut être restaurée par l'addition de chlorure ou moins efficacement par des anions parents ( $Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$ ) (Kelley, 1978).

Les hypothèses actuelles en ce qui concerne le rôle des ions chlorures dans le processus de photooxydation de l'eau pourraient être résumées ainsi:

i- Une fonction catalytique directe: Les ions chlorures se lient fonctionnellement au manganèse, soit comme "bridging ligand" dans le complexe pour faciliter le transfert d'électrons entre les manganèses (Critchley et Sargeson, 1984) ou soit comme un anion échangeable impliqué dans la compensation des charges (Wydrzinski et Sauer, 1980; Damoder et coll., 1986; Rutherford, 1989).

ii- Une fonction catalytique indirecte: Les ions chlorures se lient à des sites spécifiques sur la membrane, à proximité des ions manganèse, ce qui faciliterait la déprotonation de l'eau au cours de son oxydation (Homann, 1985; Coleman et Govindjee, 1987).

iii- Une fonction structurelle: Par des interactions électrostatiques (Itoh et Uwano, 1986) avec le PS II, le chlorure pourrait jouer un rôle important dans le maintien de l'organisation des protéines pour un fonctionnement optimal du PS II (Homann, 1988a,b; Wydrzinski et coll., 1990).

La stoechiométrie du chlorure n'est pas encore déterminée avec précision, certains auteurs ont suggéré une stoechiométrie de 4 ou 5  $\text{Cl}^-$  par PS II (Theg et Homann, 1982). Le nombre de sites de liaison du chlorure n'est pas connu, mais il semble y en avoir plusieurs (Sandusky et Yocum, 1986). Coleman et Govindjee (1987) ont proposé l'existence d'un site intrinsèque et d'un site extrinsèque. Ils ont suggéré que des histidines portées par D1 et D2 formeraient le site intrinsèque alors que des résidus lysine et arginine du polypeptide de 33 kDa lieraient le chlorure au site extrinsèque. Enfin, selon des études spectroscopiques récentes (EXAFS), le chlorure pourrait se lier directement au manganèse (Penner-Hahn et coll., 1990). Un modèle récent propose qu'un ion chlorure oscille entre deux sites pendant le cycle des états S, un de ces sites serait le calcium alors que l'autre site proposé serait le complexe de manganèse (Rutherford, 1989; Rutherford et coll., 1992).

La liaison des chlorures est fortement influencée par les polypeptides extrinsèques. Lorsque ces trois sous-unités sont présentes, l'affinité des chlorures est très élevée. Cependant, lorsque les polypeptides PE16, PE23 et PE33 sont délogés successivement de la membrane, la concentration optimale de chlorure augmente d'une façon séquentielle. Lorsque les trois polypeptides sont délogés des concentrations non physiologiques aussi élevées que 400 mM de  $\text{Cl}^-$  sont requises pour une production d'oxygène optimale (Andersson et coll., 1984; Murata et Miyao, 1985; Andersson et Åkerlund, 1987; Miyao et Murata, 1984; Ono et Inoue, 1984).

#### b) Le calcium

Le calcium est aussi un cofacteur essentiel au processus de photooxydation de l'eau. L'extraction du calcium bloque l'avancement des états S entre  $S_3$  et  $S_0$  (Boussac et coll., 1985; Boussac et Rutherford, 1988a, 1988b). Sur ces échantillons, il y a apparition d'un

nouveau signal EPR qui suggère que la structure du complexe de manganèse est perturbée en absence de calcium. Nombre d'auteurs proposent donc que le calcium joue un rôle essentiellement structurel au niveau du PS II en maintenant la structure du complexe de manganèse (voir Debus, 1992 et Yocum, 1991 pour une revue substantielle). Cependant, la possibilité que le calcium joue un rôle catalytique est aussi à considérer. Par exemple, Rutherford (1989) propose que le calcium agisse comme un site de liaison pour l'eau: le processus de photooxydation de l'eau nécessite l'accumulation de 4 équivalents oxydants, le calcium pourrait jouer le rôle de ligand pour l'eau dans les états S inférieurs, il pourrait l'échanger pour un ion chlorure juste au moment de l'oxydation de l'eau ( $S_4 \rightarrow S_0$ ). Ce modèle est fort attrayant si on considère les données spectroscopiques qui suggèrent que le calcium et le manganèse sont situés à proximité et si on considère les autres protéines liant le calcium ("calcium binding proteins") où l'eau est souvent un ligand du calcium (Debus, 1992; Boussac et Rutherford, 1994a).

Il semble qu'il y ait deux atomes de calcium par unité de PS II (Cheniae, 1988; Ono et Inoue, 1988). Un des deux atomes serait lié faiblement à la membrane, et son extraction serait suffisante pour provoquer une forte inhibition du PS II (Cammarata et Cheniae, 1987; Ono et Inoue, 1988). Le second atome serait lié fortement à la membrane et on ne connaît pas encore son rôle. Boussac et Rutherford (1988a) ont proposé l'existence d'un seul site de liaison pour le calcium dont l'affinité pourrait varier selon les états S, une faible affinité dans les états  $S_0$  et  $S_3$  et une forte affinité dans les états  $S_1$  et  $S_2$ . Ce qui réconcilierait une large controverse dans la littérature.

La liaison du calcium est fortement influencée par l'intégrité des protéines autour du complexe de manganèse. Lorsque les polypeptides de 16 et 23 kDa sont délogés de la



membrane, l'affinité du calcium diminue significativement (Ono et Inoue, 1988; Murata et Miyao, 1987).

Enfin, on ne connaît pas l'identité du ou des polypeptides fournissant des ligands au calcium. Cependant, les polypeptides du coeur du PS II (33, 47, 43, D1 et D2) portent des séquences d'acide aminés appropriées pour former un site de liaison (Yocum, 1991). Basé sur l'analogie avec des protéines liant le calcium, il apparaît que les ligands prédominants pour le calcium seraient les atomes d'oxygène dérivés des groupements carboxyl provenant soit de l'aspartate ou de la glutamine (Yocum, 1991).

Ainsi, l'interaction du chlorure et du calcium avec le PS II est fort complexe et certains auteurs questionnent sérieusement si les besoins en chlorure et calcium pour une production optimale d'oxygène sont le reflet d'une implication directe des ions dans le processus catalytique ou la conséquence secondaire de changements structuraux survenant dans le PS II (Wydrzynski et coll., 1990; Witt, 1991). Enfin, Coleman (1990) dans une intéressante revue, termine en mentionnant qu'une meilleure compréhension du rôle du chlorure nécessitera des études de liaison plus détaillées, accompagnées de la modification des polypeptides associés soit par protéolyse, par modification chimique ou par mutation dirigée.

En résumé, même si une quantité imposante de données sur le PS II sont disponibles, il reste un certain nombre ou plutôt un nombre certain de défis à relever avant d'obtenir une compréhension claire du PS II et de son importante fonction qu'est la photooxydation de l'eau. Parmi ces défis, mentionnons que l'identité moléculaire et la structure des sites de liaison des cofacteurs, que l'interaction entre les polypeptides essentiels, et que le rôle des cofacteurs dans la séquence de réaction ou dans le maintien de la structure du PS II doivent être élucidés (Ghanotakis et Yocum, 1990; Rutherford, 1989; Homann, 1988c; Hansson et

Wydrzinski, 1990; Vermass et coll., 1993). Nous croyons, comme vous le verrez dans la prochaine section, qu'à l'aide du mercure et de modificateurs spécifiques de résidus d'acide aminé il sera possible de contribuer aux efforts destinés à élucider ces questions.

### **1.3- Le mercure**

#### **1.3.1 - Généralités**

La contamination de l'environnement par les métaux lourds constitue un grave problème écologique, particulièrement dans les pays industrialisés. Nombres d'études montrent que les métaux lourds sont persistants dans l'environnement, et sont retrouvés à tous les maillons de la chaîne alimentaire (Jamil et Hussain, 1992; Nriagu et coll. 1992; Benoît et Lucotte, 1994). La contamination importante des sols et des eaux par les métaux lourds a entraîné des efforts de recherche considérables sur les effets de ces polluants chez les divers organismes vivants où il sont "bioaccumulés". Les organismes photosynthétiques constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire et ne sont pas épargnés. Au contraire, ils sont hautement sensibles aux métaux lourds: leur croissance et leur métabolisme cellulaire sont gravement altérés (Hewitt, 1959; Foy, Chaney et White, 1978). La photosynthèse, est selon Overnell (1976), le premier processus physiologique affecté par les métaux lourds. Et nul besoin de préciser qu'une "intoxication" des piliers de la chaîne trophique entraîne des effets perturbateurs sur le reste de la chaîne alimentaire (Bridgham, 1988; Hickey, 1991; Benoît et Lucotte, 1994). Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'effet du mercure sur le PS II. Avant de préciser notre problématique, la prochaine section fera un survol des sources de contamination au mercure et des effets de ce dernier sur les organismes photosynthétiques.

### 1.3.2- Contamination de l'environnement par le mercure

Le mercure est déversé dans l'environnement de diverses façons. Les principales sources atmosphériques sont l'incinération des déchets domestiques (piles, peintures, produits pharmaceutiques et papier contiennent du mercure), la combustion du bois, de la tourbe et du charbon (30% de la production totale d'énergie aux États-Unis) et l'incinération des morts (dont les plombages sont constitués à 60% de mercure). Dans ces cas, le mercure sera rejeté dans l'atmosphère, transporté par les vents et contaminera les sols et les eaux dans des régions aussi éloignées que la Baie James, si on parle de la situation Québécoise. Comme on sait, au Québec, l'inondation des sols pour les réservoirs hydro-électriques entraîne la libération du mercure dans ces bassins, et constitue un sérieux problème écologique et politique. De plus, on utilise le mercure en grande quantité dans le domaine de l'industrie chimique et électronique. Bien qu'on s'efforce de plus en plus à réduire ces utilisations, elles occasionnent souvent la contamination des sols et des eaux de multiples régions soit par voie de rejet direct ou par transfert indirect via l'atmosphère, les eaux de pluie et le ruissellement à travers les sols (Pépin, 1993; Benoît et Lucotte, 1994). Le **tableau 3**, présente diverses données sur les quantités normales et excessives de mercure retrouvées dans l'environnement ainsi que sur l'accumulation du mercure dans une chaîne alimentaire aquatique.

Le mercure pénètre directement ou indirectement les écosystèmes sous diverses formes, les principales étant : métallique ( $\text{Hg}^0$ ), ionique ( $\text{Hg}^{++}$ ), phénylmercurique ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{-Hg}^+$ ), méthylmercurique ( $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$ ) ou alkoxyalkylmercurique ( $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-Hg}^+$ ). Selon les organismes impliqués et les conditions physico-chimiques existantes, le mercure subit diverses transformations dans l'environnement. Généralement, cet élément se retrouve surtout sous forme de méthylmercure au sein des organismes de la chaîne écologique

**Tableau 3**  
**Teneurs normales et excessives en mercure dans la biosphère**

COMPOSANTES	TENEURS NORMALES	TENEURS EXCESSIVES
Sols superficiels	70 ppb	250 ppb
Humus	160 ppb	20 000 ppb
Air terrestre	5 ng/ m <sup>3</sup>	10-170 ng/m <sup>3</sup> (90 villes USA) 200-2000 ng/m <sup>3</sup> (New York) 18 000 ng/m <sup>3</sup> (autoroute japon)
Eaux de pluie	0.2 ppb	0.5 ppb
Neige	0.3 ppb	0.8 - 5.0 ppb
Eaux douces	0.1 ppb	5-20 ppb
Sédiments et particules	100 ppb	500 - 9200 ppb
Eaux marines	0.05 ppb	1.6 - 3.6 ppb
Sédiments marins	100 ppb	1200 ppb
<u>Chaîne écologique</u>	0,1 ppb	0,5 ppb
Phytoplancton	1-5 ppb	50-600 ppb
Macrophytes	10 ppb	30-500 ppb
Invertébrés fouisseurs	50-200 ppb	100 ppb
Poissons I (Corégone)	30-400 ppb	400-800 ppb
Poissons II (Perche)	170-600 ppb	700-2000 ppb
Poissons III (Brochet)	110-700 ppb	1800-3000 ppb
Oiseaux se nourrissant de poissons	1000-5000 ppb	4000-10000 ppb

D'après Van Coillie, 1992 et Benoît et Lucotte, 1994

aquatique, nonobstant le fait que ceux-ci aient la capacité d'incorporer d'autres formes de composés mercuriques (van Coillie, 1992; Benoît et Lucotte, 1994).

### 1.3.3 - Les effets du mercure sur les organismes photosynthétiques

Ainsi, tant les organismes photosynthétiques aquatiques que terrestres sont soumis aux effets néfastes du mercure. En fait, l'effet du mercure a été étudié chez les algues, les cyanobactéries et les plantes supérieures (voir **tableau 4**). Même si la croissance de ces organismes est sans équivoque altérée, le mécanisme détaillé de l'inhibition est complexe et peu connu (Chiaudani et Vighi, 1978; Hewitt, 1959; Kessler, 1986). Les processus métaboliques comme la respiration et la photosynthèse sont affectés (De Fillipis, 1981). En ce qui concerne la photosynthèse, peu d'études ont porté sur les réactions de la phase biochimique, néanmoins le cycle de Calvin est altéré par les métaux lourds (VanAssch et Clijsters, 1983). En ce qui concerne la chaîne de transport d'électrons, le mercure exerce son action à plusieurs sites. Le **tableau 4** en fait une synthèse.

Chez tous ces organismes, on a observé que des concentrations de mercure dans l'ordre du  $\mu\text{M}$ , sous forme ionique ou organique, entraînaient une diminution de la production d'oxygène causée par divers blocages le long de la chaîne de transport d'électrons. En fait, les doses provoquant 50% d'inhibition variaient entre 2 et 800 ppb pour des temps d'incubation allant de 6 jours à 1 minute respectivement. À l'aide de donneurs et d'accepteurs spécifiques, les auteurs ont décelé un grand nombre de sites touchés par le mercure. L'importance relative de chacun des sites d'inhibition est difficile à déterminer et varie selon les études effectuées. Mais sans aucun doute, le PS II est fortement affecté et dans certaines études il s'est avéré le site primaire d'inhibition de la chaîne de transport d'électrons (De Filipis, 1981).

Tableau 4

Sites d'inhibition du mercure le long de la chaîne de transport d'électrons

SITE D'INHIBITION	ORGANISME	RÉFÉRENCE
<i>Photosystème I</i>		
NADP-Ferredoxin oxydoreductase	<i>Euglena gracilis</i> <i>Spinacia oleracea</i> (chloroplastes)	De Fillipis, Hampp et Ziegler, 1981 Honeycutt et Krogmann, 1972
Centre réactionnel	<i>Anacystis nidulans</i>	Koyima et coll., 1987
<i>Plastocyanine</i>	<i>Spinacia oleracea</i> (chloroplastes)	Kato et Takamiya, 1964 Kimimura et Satoh, 1972 Yocum et Guikema, 1977
<i>Phycobilisomes</i>	<i>Spirulina platensis</i> (cell. intactes)	Murthy, Sabat et Mohanthy, 1989
	<i>Spirulina platensis</i> <i>Anacystis nidulans</i> (cell. intactes et sphérobastes)	Murthy, Bukhov et Mohanty, 1990
ATP synthétase/ATPase	<i>Spinacia oleracea</i> (chloroplastes)	Teige, Huchzermeyer et Schultz, 1990
<i>Photosystème II</i>		
Côté accepteur	<i>Spinacia oleracea</i> (chloroplastes)	Radmer et Kok, 1975 Hsu et Lee, 1988
	<i>Spirulina platensis</i> <i>Anacystis nidulans</i> (cell. intactes et sphérobastes)	Murthy, Bukhov et Mohanty, 1990
Côté donneur	<i>Spinacia oleracea</i> (chloroplastes)	Honeycutt et Krogmann, 1972 Radmer et Kok, 1975 Teige, Huchzermeyer et Schultz, 1990
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Samson, Morissette et Popovic, 1990a,b
	<i>Euglena gracilis</i>	De Fillipis, Hampp et Ziegler, 1981
	<i>Spirulina platensis</i> <i>Anacystis nidulans</i> (cell. intactes et sphérobastes)	Murthy, Bukhov et Mohanty, 1990

Au niveau du PS II, le mercure exerce son action du côté donneur et du côté accepteur du photosystème (voir **tableau 4**). Du côté donneur, le complexe de dégagement d'oxygène semble être la cible primaire, l'effet du mercure pouvant être renversé par des donneurs d'électrons comme le DPC (diphénylcarbazine) (De Filippis, 1981) et l'hydroxylamine (Honeycutt and Krogmann, 1972; Samson et coll., 1990). Ces derniers cèdent leurs électrons au delà du complexe de dégagement d'oxygène, soit directement à Z pour le DPC (Babcock, 1987) ou au complexe de manganèse pour l'hydroxylamine (Cheniae, 1971; Mei et Yocum, 1993). Par contre, même si le complexe de dégagement d'oxygène fut souvent pointé comme site d'inhibition du mercure, aucune étude n'a pu, jusqu'à maintenant, mettre en évidence clairement une ou des composantes du complexe ayant pu être affectée. Comme on a vu à la section 2, le CDO est composé de plusieurs protéines et de cofacteurs qui sont en étroite interaction et qui jouent des rôles importants dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du PS II. Nous tenterons au cours de ce projet de recherche de déterminer plus précisément quelle(s) composante(s) du CDO sont altérées par le mercure.

## 1.4 - Objectifs de la recherche

### 1.4.1 - Objectifs généraux

D'une façon générale, le présent travail comporte deux objectifs:

*A- Tenter une meilleure caractérisation du mode et du site d'action du mercure sur le côté donneur du PS II.*

La section précédente a soulevé l'importance sur le plan environnemental de caractériser l'effet de polluants tel le mercure sur le premier maillon de la chaîne alimentaire que sont les organismes photosynthétiques. Une inhibition de ce premier maillon ayant des répercussions sur tous les niveaux trophiques suivants, donc sur l'équilibre de tout l'écosystème.

La section précédente a également soulevé, le manque de données sur le site précis d'inhibition du mercure au côté donneur du PS II. Ce manque de données est attribuable, en partie, à la complexité du matériel d'étude utilisé. En effet, ces études, toutefois indispensables, ont été effectuées sur du matériel de grande complexité allant des organismes entiers, jusqu'aux chloroplastes. Nous croyons, dans une optique de caractérisation moléculaire, qu'il sera possible d'obtenir des données précieuses en utilisant du matériel de moindre complexité, comme les fragments membranaires riches en PS II. Ces fragments membranaires sont enrichis en PS II et sont dépourvus de plusieurs autres composantes de la membrane du thylacoïde qui sont elles aussi affectées par le mercure, comme la plastocyanine, l'ATP synthétase et le PS I (Dunahay et coll., 1984). Aucune étude sur le mercure n'a encore été effectuée à l'aide de ce matériel d'étude. Bien que nous devions être prudents quant à l'interprétation de nos résultats sur le plan physiologique, nous croyons



qu'il s'agit d'un matériel de choix pour une caractérisation fondamentale. Enfin, aucune étude évaluant l'impact structurel du mercure sur le PS II n'étant encore entreprise, des études d'électrophorèse seront effectuées.

De plus, les métaux lourds, dont le mercure, ont déjà été suggérés comme inhibiteurs spécifiques du transport d'électrons dans les thylacoïdes (Trebst, 1980). Selon cet auteur, les métaux lourds pourraient s'avérer de précieux outils pour l'étude de la séquence et des mécanismes détaillés du transport d'électrons dans le PS II. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs pour caractériser diverses étapes de la photosynthèse a contribué largement aux connaissances actuelles et demeure une approche puissante et peu coûteuse (Kleckowski, 1994). Cependant, avant de faire du mercure un outil d'exploration du PS II, il importe d'en connaître exactement le mécanisme d'action.

*B- Utiliser le mercure et d'autres modificateurs de cystéines comme "sondes" permettant d'explorer les relations structure-fonction au PS II.*

La section 1.2 a soulevé l'état des connaissances actuelles sur le PS II. L'identité des résidus d'acides aminés impliqués dans le processus catalytique de la photooxydation de l'eau, dans la liaison des cofacteurs, ou dans le maintien de l'intégrité structurale du PS II reste encore à déterminer et demeure une voie d'investigation à privilégier (Ghanotakis et Yocum, 1990; Rutherford, 1989; Vermass, 1993). Un bon nombre d'études de mutation sont en cours (Diner et coll., 1991; Debus, 1992; Vermass, 1993; Kless et Vermass, 1995) et l'utilisation de modificateurs chimiques spécifiques demeure encore une approche fort valable (Coleman, 1991). En effet, dans de nombreux systèmes enzymatiques solubles ou membranaires, dont le PS II (Tamura et coll., 1989; Gingras et coll., 1995; Tanaka et

Wada, 1988), la modification de résidus d'acide aminé a conduit à une meilleure caractérisation structurelle et fonctionnelle du système étudié (Lundblab, 1995; Lundblab et Noyes, 1984; Béliveau et coll., 1988; Terramani et coll., 1988; Zimmerman et coll., 1991 pour citer quelques exemples sur des protéines membranaires). Cette approche consiste à faire réagir une protéine ou un complexe protéique avec un réactif de spécificité connue pour un acide aminé donné et d'analyser l'impact de cette modification sur la fonction de la protéine étudiée. Il existe des modificateurs relativement spécifiques pour plus de la moitié des 21 résidus d'acides aminés (Riordan, 1979; Lundlab et Noyes, 1984). Même si elles sont destinées à un seul type d'acide aminé, la plupart de ces réactions sont à prime abord, de spécificité relative, dans le sens qu'elles peuvent survenir avec tous les résidus de ce type sur la protéine. Heureusement, certains résidus, à cause de leur microenvironnement dans la structure tridimensionnelle de la protéine, peuvent montrer une extrême réactivité à la modification. Souvent, ces résidus participent dans la fonction biologique. En fait, les caractéristiques structurales générant une fonction sont étroitement reliées à celles qui donnent lieu à une réactivité exceptionnelle. À cause de cette réactivité unique, ces résidus peuvent être modifiés spécifiquement, ce qui facilite les études de corrélation structure-fonction (Lundblab, 1995; Riordan, 1979). Ainsi, des études systématiques de modification, accompagnées de contrôles rigoureux apportent de précieuses informations sur le fonctionnement des protéines. Les enzymes constituent la classe de protéines la plus largement investiguée par modification chimique. Néanmoins, les anticorps, les hormones, les transporteurs membranaires et les récepteurs membranaires ont vu des détails de leur fonctionnement mis en lumière par cette approche. Dans le cas du PS II, des études modifiant les histidines (Tamura et coll., 1989; Hedge et coll., 1995); des tyrosines (Gingras et coll., 1995) et des cystéines (Gingras et coll., 1995; Tanaka et Wada, 1988) ont

été rapportées. Compte-tenu de l'affinité exceptionnelle du mercure pour les groupements -SH libres des protéines ( $K = 10^{41.6}$ )<sup>4</sup> (Jacobson et Turner, 1980 ; Falchuk et coll., 1977; Webb, 1976), nous espérons jeter une lumière nouvelle sur l'implication de ce résidu d'acide aminé dans le mécanisme de photooxydation de l'eau et ce, en étudiant l'impact structural et fonctionnel du mercure et de d'autres composés modificateurs de cystéines sur le PS II.

Enfin, compte-tenu des faibles concentrations auxquelles le mercure exerce son action, nous nous attendons à un effet hautement spécifique de ce métal.

#### 1.4.2 - Objectifs spécifiques

Nous espérons atteindre ces deux objectifs généraux en tentant de répondre aux trois questions suivantes:

*1- Est-ce que le mercure interfère avec un ou des cofacteurs impliqués dans le processus de photooxydation de l'eau au PS II?*

Trois cofacteurs, le chlorure, le manganèse et le calcium sont impliqués dans le processus de photooxydation de l'eau (voir section 1.2.3). Compte-tenu de la nature divalente du mercure, on pourrait s'attendre à ce que les sites de liaison du manganèse et/ou du calcium puissent être affectés par ce métal. Samson et coll. (1990) observaient 4 sites de liaison du mercure lors de leurs études sur l'algue *Dunaliella tertiolecta*. Le site catalytique du CDO, porte selon la majorité des auteurs, 4 manganèse (voir section 1.2.3.2). Samson et coll.

---

<sup>4</sup> K représente la constante de formation de complexe (ou de stabilité) entre un métal (M) et son ligand (L). D'une façon simplifiée, lorsque,  $M + L \rightleftharpoons ML$   $K = [ML] / [M] \times [L]$ . Il existe évidemment des constantes de stabilité successives,  $K_n$  selon le nombre de ligands pouvant se lier au métal ( d'après Ringbom, 1967). Ainsi, plus la valeur de K est élevée, plus grande est l'affinité entre le mercure et son ligand.

(1990) suggèrent alors que le mercure exerce son action aux sites de liaison du manganèse, mais aucune étude de dosage du manganèse, ou de protection ou de compétition par ce dernier n'ont été effectuées pour vérifier cette hypothèse. Dans le même ordre d'idée, on retrouve dans la littérature nombre d'exemples de substitutions chez des protéines portants des métaux. Par exemple, des protéines liant le calcium, la parvalbumine et l'ovalbumine se sont vu changer de conformation suite à un ajout de cadmium et ont retrouvé leur conformation originale lors d'une addition subséquente de calcium (Jacobson et Turner, 1980). Yocum (1991) a montré que le cadmium, un autre métal inhibiteur du PS II, compétitionne avec le calcium pour son site de liaison. Qu'en est-il du mercure? Enfin, le chlorure joue un rôle de stabilisation structurelle sur le PS II. Le mercure peut-il affecter indirectement l'équilibre en chlorure en modifiant la structure d'une ou de protéines stabilisées par ce dernier ?

Pour toutes ces considérations, nous croyons qu'il est d'un grand intérêt d'effectuer, sur notre matériel d'étude, des expériences de protection et de compétition entre le mercure et les trois cofacteurs essentiels au dégagement d'oxygène.

## *2- Est-ce que le mercure modifie la composition polypeptidique du PS II?*

Certaines études sur les métaux lourds et d'autres polluants ont montré que certains polypeptides extrinsèques du PS II pouvaient être délogés en présence de ces derniers. Par exemple, Miller (1985) montrait que les polypeptides extrinsèques de 16 et 23 kDa étaient délogés de la membrane suite à un traitement au zinc, alors que Makymiec et Baszynski (1988) montraient que les trois polypeptides de 33, 23 et 16 kDa étaient délogés en présence de cadmium. Récemment, Rashid et coll. (1994) ont observé que le plomb et le zinc provoquaient un relargage important de PE16, PE23 et une libération partielle de PE33.

Même si le mercure exerce son action à des concentrations beaucoup plus faibles que ces deux métaux (de l'ordre du  $\mu\text{M}$  comparativement à l'ordre du  $\text{mM}$ ), il est important de vérifier si le mercure perturbe l'organisation de ces trois polypeptides qui forment une sorte de barrière entre le site catalytique du PS II et le milieu exogène (Wydrzinski, 1990; Rutherford, 1989). Enfin, on a vu, sur d'autres systèmes membranaires, que le mercure affecte l'ancrage d'une protéine transmembranaire, la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Imesch, Moosmayer et Anner, 1992). Il sera donc d'un grand intérêt de voir, l'effet du mercure sur ce complexe multiprotéique qu'est le PS II.

### *3- Est-ce que le mercure interagit avec une ou des cystéines du PS II?*

Compte-tenu de la grande affinité du mercure pour les cystéines, nous croyons qu'il serait fort intéressant de déterminer si ce résidu est affecté en présence du mercure. Plusieurs polypeptides du PS II portent des cystéines comme on peut voir au tableau 5, dont certaines sont exposées à la face luminale du thylacoïde. Cependant, compte tenu de l'organisation tridimensionnelle de ces protéines et de leur interaction entre elles, il est difficile de prévoir si ce résidu pourrait être accessible et affecté par le mercure. Des études comparatives avec divers modificateurs de groupements  $-\text{SH}$ , comme le PCMBs, l'acide iodoacétique et le NEM permettront de vérifier si une ou des cystéines sont modifiées (Lundblad et Noyes, 1984).

**Tableau 5**  
**Contenu en cystéines des polypeptides du PS II**

POLYPEPTIDE	CYSTÉINES	RÉFÉRENCES
D1 (32)	2	Svensson et coll., 1991
D2 (32)	2 4	Coleman et Govindjee, 1987 Svensson et coll., 1991
Cytochrome <i>b559</i> (9)	0	Murphy, 1986
Cytochrome <i>b559</i> (4)	0	Murphy, 1986
CP47	2	Bricker, 1990
CP43	4	Bricker, 1990
Phosphoprotéine (9)		
33	2 2 2	Oh-Oka et coll., 1986 Eaton-Rye, 1989 Watanabe et coll., 1987
23	0 0	Murata et coll., 1987 Jansen et coll., 1987
16	0	Jansen et coll., 1987
22	0	Kim, Pichersky et Yocum, 1994
10		
5		
CCLII (27)	1	Morishige et Thornber, 1992
CCLII(25)	1	Morishige et Thornber, 1992
CP29 (29)	1	Morishige et Thornber, 1992
CP27 (27)		
CP24 (24)		

Il est à noter que le mercure peut se lier à d'autres ligands sur les membranes biologiques. En effet, Delnomdedieu et ses collaborateurs (1989,1992) ont suggéré, suite à des études de liaison sur des membranes modèles, que les phospholipides PS et PE constituent une nouvelle classe de sites de liaison pour le mercure et proposent que ces interactions constituent un nouveau mécanisme de toxicité de ce dernier au niveau membranaire. Cependant, les effets observés lors de leurs études ont été obtenus pour des concentrations de mercure de l'ordre du mM, et les effets toxiques observés au PS II pour l'ensemble des études répertoriées surviennent dans l'ordre du  $\mu\text{M}$ , voire du nM. Sans omettre la possibilité de modification des lipides membranaires, nous croyons que dans le cas qui nous concerne, les protéines soient la cible primaire du mercure.

### **1.5 - Importance et originalité de la recherche**

L'intérêt et les retombées de ce travail sont multiples, tant sur le plan fondamental qu'environnemental.

Sur le plan fondamental:

D'abord, nous croyons que par l'ensemble de ces travaux, nous obtiendrons une meilleure caractérisation du site d'action du mercure et une meilleure connaissance du PS II. En effet, en utilisant un matériel d'étude de moindre complexité (FMRPS II) et en utilisant un ensemble de méthodes complémentaires (électrophorèse, dégagement d'oxygène et induction de fluorescence) pour évaluer l'impact structurel et fonctionnel du mercure, nous croyons obtenir de nouvelles informations sur le mode d'action de ce métal sur le PS II, et de nouvelles informations sur l'organisation fonctionnelle et structurelle de ce photosystème.

L'intérêt des métaux lourds comme sondes pour explorer des relations structure-fonction chez les protéines est très bien dégagé dans la revue de Jacobson et Turner (1980), et dans nombres d'études répertoriées dont celle de Anner et coll. (1992a,b). Ces derniers ont causé à l'aide du mercure, des modifications structurelles et fonctionnelles jamais encore observées avec d'autres types d'inhibiteurs, et ont élucidé des détails fonctionnels de la protéine étudiée. Nous croyons donc, qu'à l'instar des études effectuées sur d'autres protéines membranaires, comme par exemple, la Na/K ATPase (Anner et coll., 1992a), des canaux calciques des neurones (Büsselberg, 1991) et de divers récepteurs membranaires (Simmons et coll., 1990; Terrami et coll., 1988), le mercure pourra se révéler une sonde efficace pour explorer des détails fonctionnels et structurels du PS II.

De plus, selon les résultats obtenus sur l'implication des résidus cystéines dans le processus de dégagement d'oxygène au PS II, ces informations pourront servir pour l'élaboration des études de mutation dirigée. Les résidus histidines, aspartate et glutamine ont fait l'objet d'un certain nombre d'études de mutation (Debus, 1992), cependant, les cystéines n'ont que très rarement et très récemment fait l'objet de telles études (Burnap et coll., 1994).

Sur le plan environnemental:

Malgré le fait que les études seront effectuées sur des fragments membranaires plutôt que sur des organismes entiers et qu'on s'éloigne ainsi de la réalité physiologique, nous croyons tout de même à l'intérêt de ce projet sur le plan environnemental, moyennant une grande prudence quant à l'interprétation des résultats et à leur extrapolation. D'abord, nos résultats devraient contribuer à une meilleure compréhension du mode de toxicité du mercure sur les piliers de la chaîne alimentaire que sont les organismes photosynthétiques.



Il a été démontré que les plantes accumulent le mercure et les métaux en général dans leurs tissus, tant au niveau des racines, des pétioles, qu'au niveau des feuilles (Jamil et Hussain, 1992; Wagner, 1986). Compte-tenu de la contamination imposante de l'environnement par les métaux lourds, il y a un intérêt de recherche dans l'utilisation de diverses biomasses, dont les plantes, comme systèmes d'accumulation et de concentrations des métaux dissous en solution (Scott, 1992). L'information obtenue par l'ensemble des études de toxicité des métaux sur les plantes, dont celles suggérées ici, serviront sûrement dans le développement de cette méthode de dépollution.

De plus, le mercure est hautement toxique chez la plupart des organismes vivants, mais le mécanisme exact de sa toxicité demeure encore obscur et fait l'objet d'intenses recherches. Les informations obtenues sur le PS II, pourront être utiles et comparées (toujours avec précaution) à ce qui est obtenu chez les autres organismes étudiés, des bactéries jusqu'à l'humain chez qui le mercure affecte le rein, le foie, le système nerveux et l'appareil reproducteur.

Et je termine, en citant deux passages d'un article de Wollman, 1991 où l'intérêt général du présent projet est aussi dégagé:

"La bioénergétique de la photosynthèse demeure un domaine de recherche dans lequel un grand nombre de questions stimulantes n'ont pas encore été élucidées. L'approche combinée des méthodes physiques, de la génétique moléculaire et de la biochimie devrait profiter au domaine au cours de la prochaine décennie..."

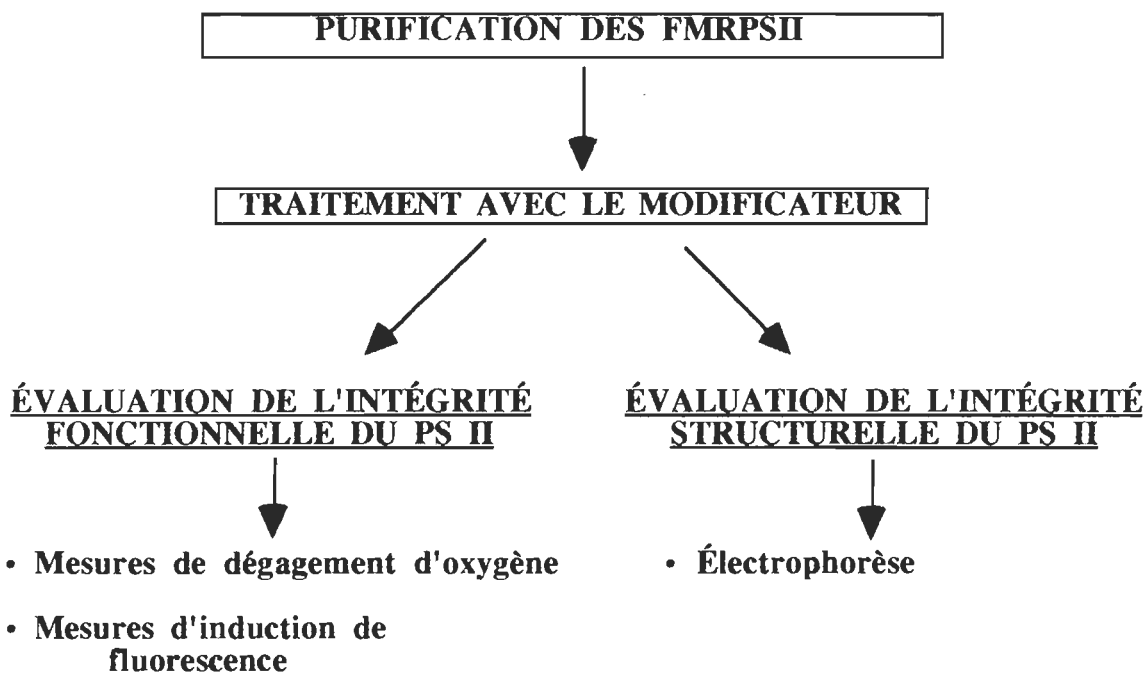
"La biochimie et la génétique moléculaire ont renouvelé beaucoup la vision sur les organismes photosynthétiques. Ces organismes peuvent maintenant être utilisés comme systèmes modèles dans l'étude de questions plus générales en biologie, comme les études de relation structure-fonction chez les protéines membranaires.."

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1- Approche générale

Tel que l'illustre la **figure 7**, l'approche expérimentale peut se résumer ainsi: il s'agit d'abord d'isoler notre matériel d'étude, des fragments membranaires riches en photosystème II (FMRPSII), de les traiter avec le mercure ou d'autres modificateurs et ensuite d'évaluer l'impact fonctionnel et structurel des traitements pratiqués.



**Figure 7.** Vue d'ensemble de l'approche expérimentale

Ces méthodes seront maintenant décrites en détails.

## 2.2 - Choix et préparation du matériel d'étude

Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé deux espèces de plantes, l'orge (*Hordeum vulgare*) et l'épinard (*Spinacea oleracea*). Ces deux plantes sont de type C<sub>3</sub>, type largement répandu chez les plantes supérieures. Les plantes de type C<sub>3</sub> sont homogènes en ce qui a trait aux propriétés des PS II de leurs chloroplastes, ce qui n'est pas le cas pour les espèces du type C<sub>4</sub> (Popovic et coll., 1987a, b). L'orge est une plante facile à cultiver d'une façon homogène, ce qui permet l'obtention de résultats très reproductibles. De plus, en cultivant nous mêmes nos plantes, nous avons un étroit contrôle des conditions de croissance. Les semences utilisées proviennent du marché local et sont cultivées sur vermiculite. Les plantes sont arrosées quotidiennement avec de l'eau du robinet et sont illuminées en permanence par une lampe au sodium à haute pression. L'intensité lumineuse au niveau des plantes étant de 40 mW/cm<sup>2</sup>. Les feuilles peuvent croître normalement sous ces conditions pendant 9-10 jours. La récolte s'effectue le septième jour, c'est à ce moment qu'on note une activité optimale des PS II. Les épinards sont plus difficiles à cultiver mais sont largement utilisés pour les travaux sur le PS II. On se les procure généralement au marché. Malgré le fait que nous avons peu de contrôle sur les conditions de croissance, nous avons tout de même utilisé cette espèce dans le but de faire des comparaisons avec les résultats de la littérature et nous avons aussi obtenu des résultats reproductibles.

### 2.2.1- Préparation des fragments membranaires riches en photosystèmes II

Les fragments membranaires riches en photosystèmes II (FMRPSII) sont préparés selon la même méthodologie que ce soit pour l'orge ou l'épinard, seul le contenu des solutions varie selon le type de plante utilisé. Le tableau 6 montre le contenu des diverses solutions

et la figure 8 schématise la procédure qui consiste à isoler des fragments membranaires provenant de la région empilée (ou granaire) des thylacoïdes. Comme mentionné précédemment (voir section 1.1.3.1), environ 80% des PS II se retrouvent dans cette région du thylacoïde alors que les complexes protéiques du PS I et de l'ATP synthétase sont presque exclusivement localisés dans les lamelles stromatiques.

La procédure présentée ici est une adaptation de la procédure originale de Berthold, Bacock et Yocum (1981). Dans un premier temps les feuilles sont rincées à l'eau distillée et sont coupées en petits fragments de 1 cm et mélangées à une solution de broyage gardée à 4°C. Une masse de 100 g de feuilles sera broyée dans 250 ml de solution de broyage à l'aide d'un mélangeur domestique. La suspension résultante est rapidement filtrée à l'aide d'un tamis dont les pores sont de 25 µm de diamètre, ce qui laisse passer les chloroplastes libérés. La suspension de chloroplastes (contenant aussi mitochondries et contenu cytosolique) est ensuite rapidement centrifugée pour séparer ces derniers des enzymes cytosoliques et des petits débris cellulaires libérés lors du broyage. Le culot contenant les chloroplastes intacts sera ensuite resuspendu dans une solution hypotonique. À cette étape, les chloroplastes éclatent et libèrent les membranes thylacoïdiennes. Une centrifugation permet de séparer les thylacoïdes du contenu stromatique. Les thylacoïdes ainsi recueillis dans le culot seront resuspendus dans une solution de resuspension et subiront par la suite un traitement au Triton X-100. On ajoutera à cette suspension un volume d'une solution de traitement permettant d'obtenir un ratio Triton / Chl de 25 : 1 et une concentration finale de Chl de 1 mg/ml. Les thylacoïdes sont incubés en présence de Triton X-100 pendant 20 min sous agitation faible. Ensuite, la suspension est centrifugée à basse vitesse pour retirer les débris et l'amidon libérés lors de la digestion. Le surnageant contenant maintenant des fragments membranaires provenant de la région granaire et riches en PS II sera centrifugé à haute vitesse pour séparer les FMRPSII de la solution de Triton X-100. Les FMRPSII seront

finallement resuspendus dans une solution d'entreposage et congelés dans l'azote liquide jusqu'à utilisation. Il est à noter que l'ensemble des procédures ont été effectuées sur glace à 4°C dans le but de préserver l'intégrité de notre matériel biologique.

**Tableau 6**

**Composition des milieux utilisés pour la préparation des FMRPSII**

PRODUIT	ORGE	ÉPINARD
<u>MILIEU DE BROYAGE:</u>		
Tricine-NaOH	50 mM (pH 7,8)	50 mM (pH 7,6)
NaCl	10 mM	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	5 mM
Sorbitol	400 mM	400 mM
Ascorbate	0,1 % (p/v)	0,1 % (p/v)
PMSF	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
<u>MILIEU HYPOTONIQUE</u>		
Tricine-NaOH	50 mM (pH 7,8)	50 mM (pH 7,6)
NaCl	10 mM	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	5 mM
<u>MILIEU DE RESUSPENSION</u>		
MES-NaOH	20 mM (pH 6,0)	20 mM (pH 6,3)
Sorbitol	300 mM	-----
NaCl	10 mM	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	5 mM
<u>MILIEU DE TRAITEMENT</u>		
MES-NaOH	20 mM (pH 6,0)	20 mM (pH 6,3)
Sucrose	400 mM	-----
NaCl	10 mM	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	5 mM
Triton X-100	4%	4%
<u>MILIEU D'ENTREPOSAGE</u>		
MES-NaOH	20 mM (pH 6,3)	20 mM (pH 6,3)
Sucrose	400 mM	-----
NaCl	10 mM	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	5 mM

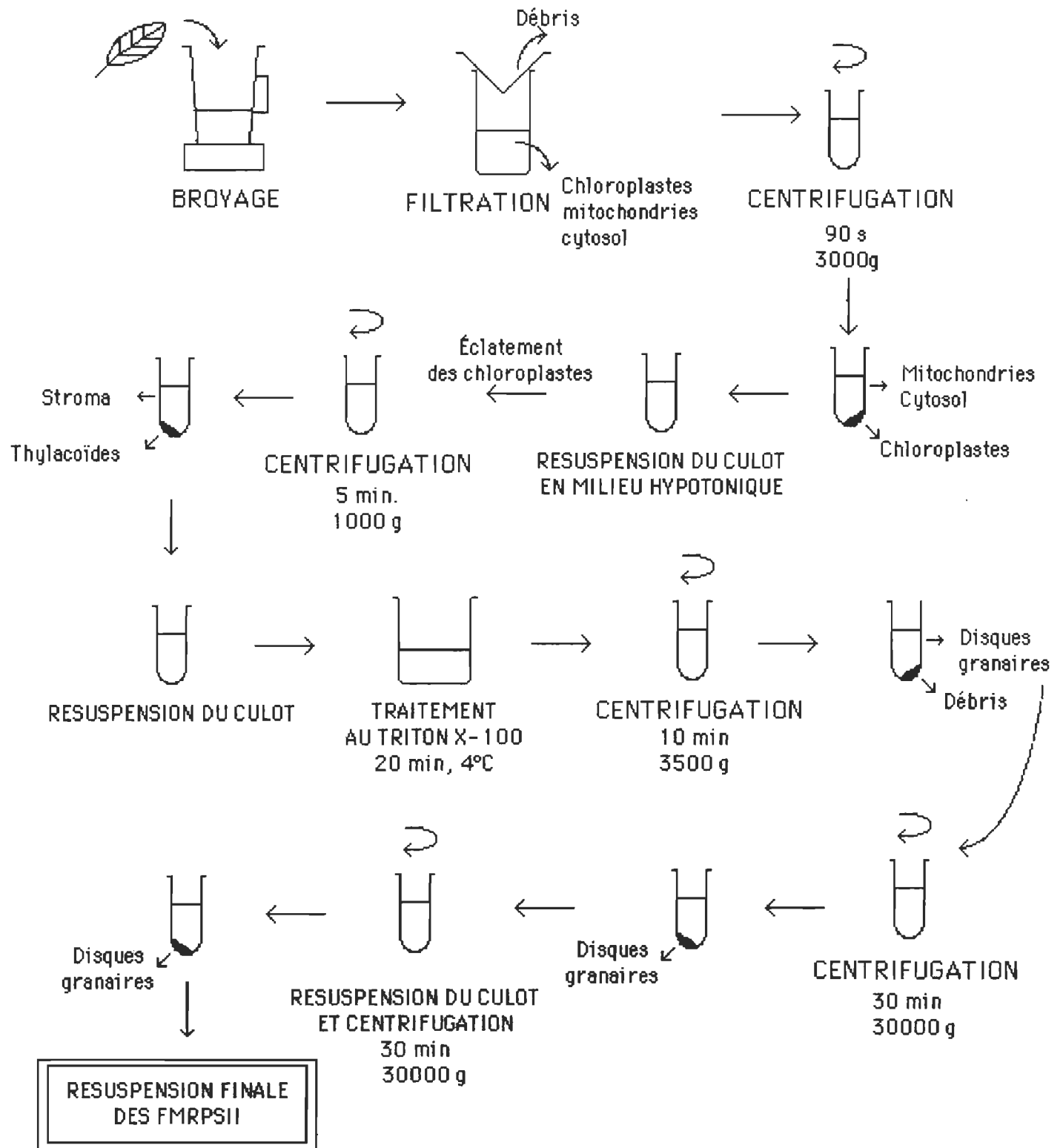
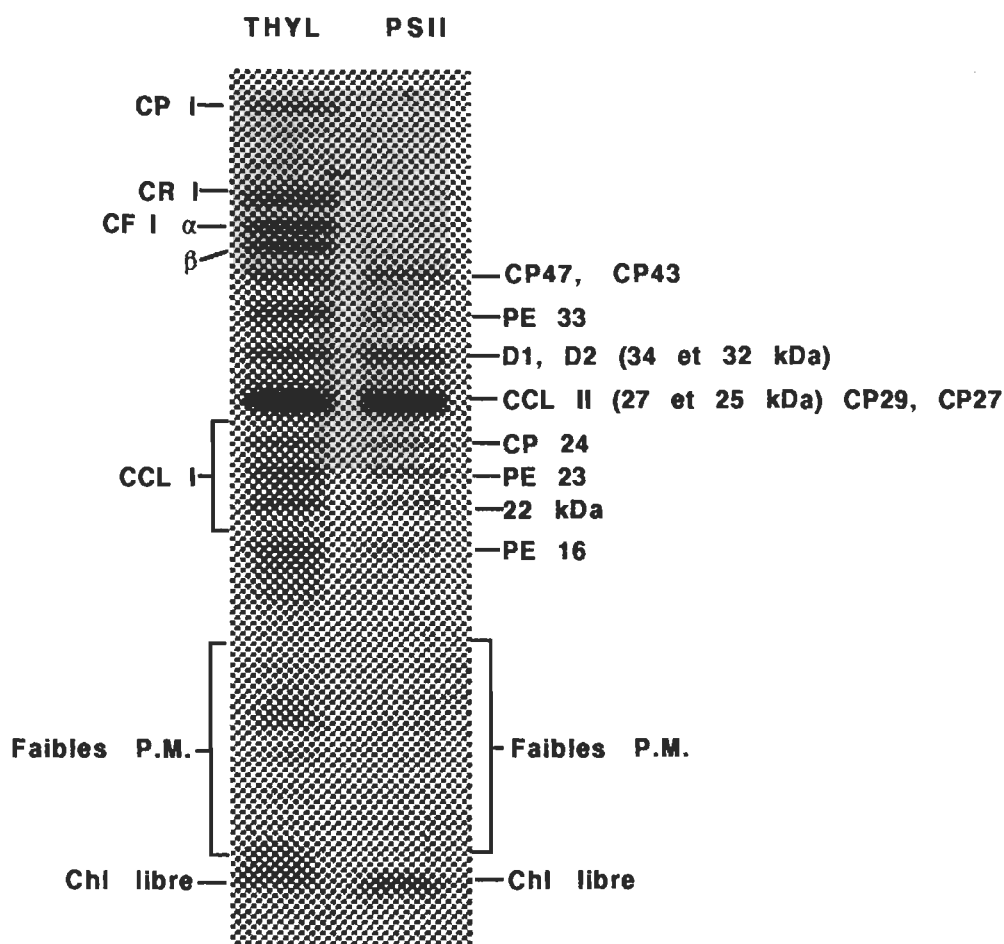


Figure 8: Préparation des fragments membranaires riches en PS II

Un ensemble de contrôles ont été effectués dans le but de vérifier l'intégrité et la pureté de nos fragments membranaires. D'abord, le profil électrophorétique d'une suspension de thylacoïdes et d'une suspension de FMRPSII ont été comparés (figure 9). On note clairement la disparition de bandes associées au PS I (CP I, CR I et CCL I) et à l'ATP synthétase (CF I  $\alpha$  et  $\beta$ ), qui sont principalement localisés dans les lamelles stromatiques, indiquant donc, un haut degré de pureté de notre préparation.



**Figure 9.** Comparaison du profil électrophorétique des FMRPSII (PSII) et des thylacoïdes (THYL). À gauche du tracé sont identifiées les principales protéines associées au PSI et à l'ATP synthétase et à droite celles associées au PSII (D'après Hooper, 1984).

[CF: Facteur de couplage; CCL: Complexe collecteur de lumière; CP: Complexe chlorophylle-protéine; C.R.: Centre réactionnel; PE: Polypeptide extrinsèque]. Consulter la figure 4 et le tableau 1 pour mieux visualiser les polypeptides du PS II.



Le ratio Chl *a* / *b* nous apporte aussi une indication de la pureté de nos préparations. En effet, les antennes du PS II contiennent presque toute la Chl *b* des chloroplastes, contrairement aux antennes du PS I qui sont principalement constituées de Chl *a*. En fait, le ratio Chl *a*/*b* pour une préparation de thylacoïdes (contenant PS II et PS I) se situe normalement autour de 3, alors que le ratio d'une suspension de FMRPSII se situe normalement autour de 2 (Albertsson et coll., 1994). Sur nos préparations, le ratio Chl *a*/*b* était mesuré à la mi-expérience sur la suspension de thylacoïdes et à la fin sur nos suspensions de FMRPSII. Nous avons obtenu des valeurs tout à fait conformes (2.9 à 3.1 pour les thylacoïdes et 1.9 à 2.2 pour les FMRPSII) sur toutes nos préparations.

En ce qui concerne l'entreposage dans l'azote liquide, nous avons déterminé expérimentalement le milieu d'entreposage qui préservait le mieux l'intégrité fonctionnelle et structurelle de nos membranes. Nous avons aussi analysé l'activité de nos préparations en fonction du temps d'entreposage. Les résultats de cette étude sont montrés dans la première partie du chapitre 3. Mentionnons ici, que nos préparations présentent une activité intégrale pendant au moins 30 jours d'entreposage (80% et plus d'activité de dégagement d'oxygène).

Cette préparation de FMRPSII présente donc de précieux avantages pour l'étude de l'effet du mercure sur le PSII. D'abord, ces membranes permettent d'étudier l'impact du mercure sur le PSII indépendamment des autres sites où il peut exercer son action comme le PS I ou l'ATP synthétase (voir section 1.3.3). Ensuite, sur ce type de préparation, nous obtenons des fragments de membranes et non des structures vésiculaires fermées (Dunahay et coll., 1984), il est ainsi possible de contrôler étroitement la composition du milieu de part et d'autre de la membrane thylacoïdienne atténuant l'impact des phénomènes de perméabilité. Enfin, cette préparation membranaire contient des PSII dans leur environnement lipidique natif et

encore associés à leur antenne. Cette préparation présente une combinaison unique de pureté, de rendement de transport d'électrons élevé et de stabilité (Dunahay et coll., 1984). On doit beaucoup des connaissances actuelles sur le PSII à ce type de préparation et nous espérons élucider le mécanisme d'action du mercure sur le PSII à l'aide de ce matériel de choix.

## **2.3- Traitements des FMRPSII**

### **2.3.1- Traitement au mercure et autres modificateurs**

Les FMRPSII sont retirés de l'azote liquide et décongelés à l'obscurité, à la température de la pièce. Une fois décongelée, la suspension sera immédiatement transférée sur glace et gardée ainsi jusqu'à utilisation. Pour éviter toute interférence d'ions comme le chlorure (cofacteur impliqué dans le processus de dégagement d'oxygène) ou le sodium, les FMRPSII seront lavés dans un milieu ne contenant que du sucrose, 400 mM et du tampon Mes-TMAOH, 20 mM, pH 6,3. En effet, Waggonner et coll. (1989) ont démontré que l'ion sodium pouvait avoir un effet inhibiteur sur l'activité du PSII à des concentrations supérieures à 10 mM alors que l'ion  $\text{TMA}^+$  n'exerçait aucun effet. Alors le tampon utilisé dans l'ensemble des expériences est le TMAOH et le sel de chlorure (pour les expériences de réactivation), le TMACl. Lors du traitement, on ajoutera à la suspension de FMRPSII la concentration souhaitée de mercure sous diverses formes ( $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ) à partir de solutions mères préalablement préparées. La concentration finale de la suspension de FMRPSII est généralement de 15  $\mu\text{g Chl/ml}$  lors du traitement. L'incubation se fait dans l'obscurité à 22°C. Au temps souhaité, les FMRPSII seront immédiatement centrifugés et lavés s'ils sont destinés à une analyse électrophorétique ou seront resuspendus dans un

milieu contenant du DCBQ s'ils sont destinés à la mesure du dégagement d'oxygène (voir les détails aux sections 2.4.1 et 2.4.2). La même procédure est suivie lors des traitements effectués avec les autres modificateurs comme le NEM, le PCMBS, le DTT etc....

### **2.3.2- Enlèvement des polypeptides extrinsèques**

Les polypeptides extrinsèques PE16 et PE23 ont été délogés de la membrane suite à un traitement standard au NaCl, mis au point par Nakatani (1984). La suspension de FMRPSII est incubée à l'obscurité, sur glace, pendant 30 minutes dans un milieu contenant 1M NaCl et 20 mM Mes-TMAOH, pH 6,3. La concentration finale de la suspension est de 1 mg Chl/ml. Par la suite, la suspension sera centrifugée pendant 5 minutes à vitesse maximale (13 600g) dans une centrifugeuse de type Eppendorf. Le culot sera resuspendu dans un tampon de lavage contenant 400 mM de sucrose et 20 mM de Mes-TMAOH pH 6,3. La suspension sera centrifugée de nouveau et le culot resuspendu dans un petit volume de tampon de lavage.

Pour ce qui est de l'enlèvement simultané des polypeptides extrinsèques PE16, PE23 et PE33, un traitement à l'urée, mis au point par Miyao et Murata (1984b) a été utilisé. Les FMRPSII sont incubés à l'obscurité, pendant 30 minutes, sur glace dans un milieu contenant 2.3 M d'urée, 200 mM de NaCl et du Mes-NaOH pH 6,5. La concentration finale de Chl est de 500 µg/ml. Les étapes subséquentes de centrifugation et de lavage sont identiques à celles décrites dans le paragraphe précédent.

Les polypeptides libérés au cours de ces traitements ont pu être recueillis dans le surnageant provenant de la première centrifugation. Ce dernier a d'abord été centrifugé pendant 40 minutes à vitesse maximale (13 600g), ceci permettant d'enlever les fragments membranaires encore présents. Le surnageant a par la suite été dialysé contre un gradient de

sucrose dans le but de concentrer les protéines. Il a finalement été dialysé contre un tampon de lavage et utilisé pour analyse électrophorétique.

## **2.4- Méthodes analytiques**

### **2.4.1- Séparation des protéines par électrophorèse**

L'impact du mercure et des autres modificateurs sur le PSII a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon une méthode adaptée permettant une séparation optimale des polypeptides du PSII (Volker et coll., 1985). Après les traitements au mercure ou aux modificateurs, les suspensions de FMRPSII ou les surnageants dialysés sont dilués dans une solution de digestion composée de 10% mercaptoéthanol, 2% dodécyl sulfate de sodium (SDS), 20% sucrose, 1 mM EDTA et 10 mM Trizma (pH 7.0). L'incubation dure 30 minutes à la température de la pièce. Ensuite, des aliquots de volume variable contenant chacun 8 µg de Chl seront déposés sur un gel d'entassement contenant 4% de polyacrylamide (voir le **tableau 7** pour la composition détaillée des gels et des tampons). Ce gel est suivi d'un gel de résolution contenant 15% de polyacrylamide. Ces deux gels sont montés sur un système miniature de Hoefer Scientific. Le montage sera déposé délicatement dans un bassin contenant un tampon d'électrode à pH 8.3 et sera surmonté d'une chambre supérieure contenant le même tampon (d'après Laemli, 1970, voir **tableau 7**). Les protéines chargées par le SDS sont soumises à un champ électrique de 18 mA pendant environ deux heures à l'aide d'un générateur de courant (LKB2303).

Tableau 7

## Composition des gels et des tampons utilisés pour l'électrophorèse

PRODUIT	CONCENTRATION
<b><u>Gel de résolution</u></b>	
Acrylamide	15%
Tris-HCl (pH 8.8)	375 mM
SDS	0,1% (p/v)
Persulfate d'ammonium	0,1% (p/v)
TEMED	0,07% (v/v)
<b><u>Gel d'entassement</u></b>	
Acrylamide	4 %
Tris-HCl (pH 6.8)	125 mM
SDS	0,1% (p/v)
Persulfate d'ammonium	0,05% (p/v)
TEMED	0,05% (v/v)
<b><u>Tampon d'échantillon</u></b>	
Tris-HCl (pH 6.8)	125 mM
SDS	4 % (p/v)
Glycérol	20 % (v/v)
2-mercaptoéthanol	10 % (v/v)
<b><u>Tampon d'électrode</u></b>	
Tris-HCl (pH 8,3)	25 mM
SDS	0,1 % (p/v)
Glycine	192 mM

Une fois la migration des protéines complétée, le gel est coloré au bleu de Coomassie selon la méthode standard (Hames et Rickwood, 1981). Un densitomètre LKB Ultra Scan XL jumelé au programme informatique Gel Scan XL 2.1 sont utilisés pour évaluer l'intensité relative de chaque bande protéique selon une méthode d'intégration sous la courbe. Même si une quantité équivalente de matériel est déposée dans chaque puits, chaque ligne est normalisée en comparant l'intensité d'une bande non modifiée par le mercure ou tout autre composé utilisé. L'appareillage est décrit au **tableau 9** (page 69).

#### **2.4.2- Dégagement d'oxygène par polarographie**

Une façon d'évaluer l'intégrité fonctionnelle du PSII suite à un traitement au mercure est de mesurer sa production d'oxygène. En effet, comme mentionné dans l'introduction, le PSII est le site de la membrane photosynthétique où s'effectue l'important processus de photooxydation de l'eau et conduisant à la formation d'O<sub>2</sub>. Pour qu'il y ait production d'O<sub>2</sub>, les électrons devront circuler librement de l'eau jusqu'à un accepteur artificiel d'électrons le DCBQ, qui captera les électrons en provenance du site Q<sub>b</sub> du PSII (voir **figure 10**). Toute altération de l'intégrité fonctionnelle du PSII influencera donc l'apparition du produit de la réaction, l'O<sub>2</sub>.

À l'aide d'une électrode de type Clark il est possible de détecter l'O<sub>2</sub> produit. Il s'agit d'une électrode constituée d'une anode d'argent et d'une cathode de platine reliées par un pont de KCl mi-saturé. Lorsqu'une tension de l'ordre de 600 à 700 mV est appliquée, la surface du platine catalyse la réduction de l'oxygène et sa transformation en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'électron perdu par la platine tend à dissiper la différence de tension entre l'anode et la cathode. Le courant ainsi généré est directement proportionnel au taux d'oxygène consommé à

la cathode. Si le milieu est agité convenablement, ce courant est directement proportionnel au taux d'oxygène en solution (Delieu et Walker, 1972). Il est à noter que l'électrode est séparée du milieu de réaction par une membrane perméable à l'oxygène, de cette façon on peut ajouter des accepteurs artificiels d'électrons pour soutenir le transport d'électrons sans qu'il y ait risque que ces derniers se réduisent directement à l'électrode, ce qui fausserait évidemment les résultats. L'appareillage utilisé au cours de cette expérience est décrit au tableau 9.

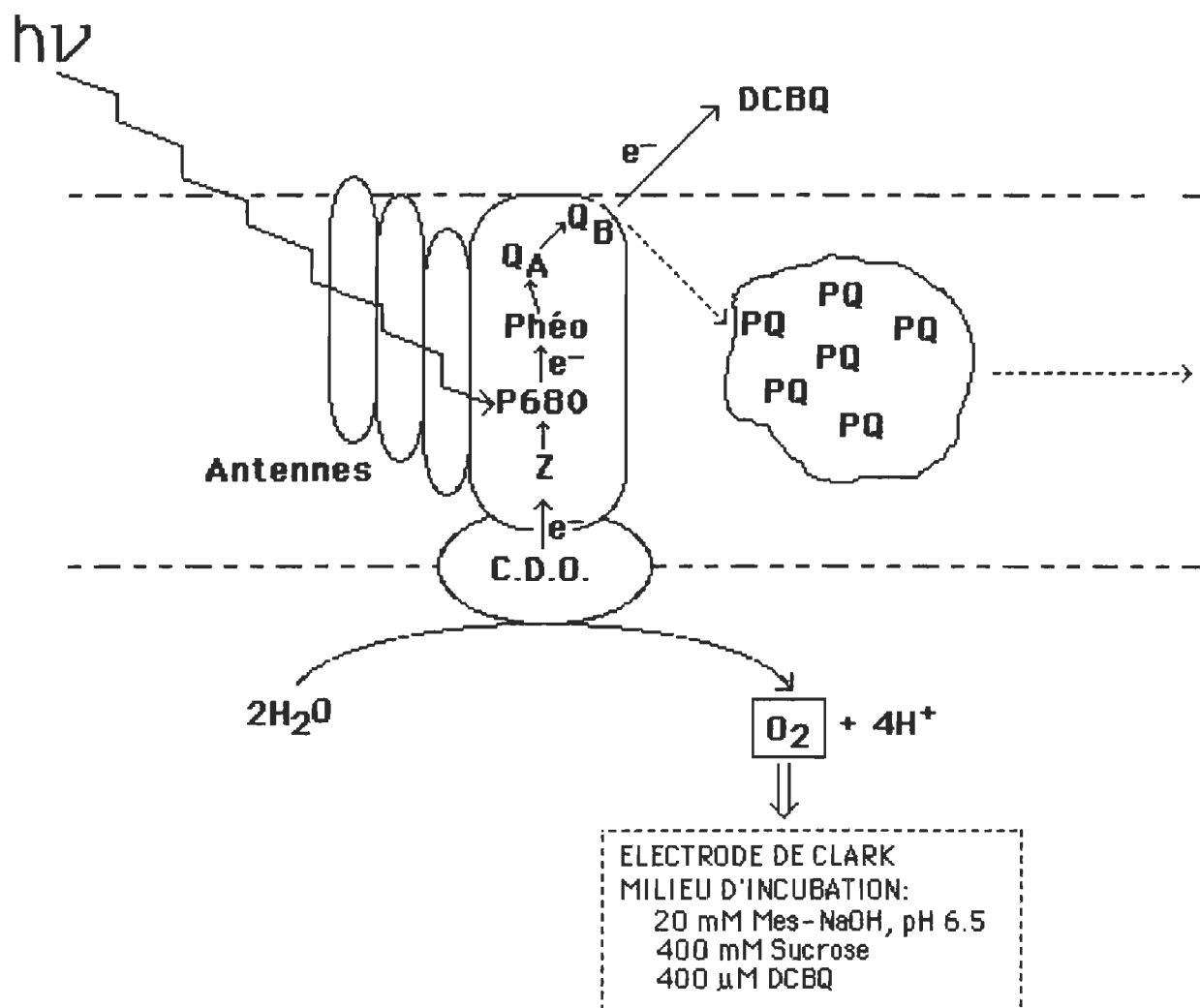


Figure 10. Représentation schématique du phénomène de dégagement d'oxygène au PSII et quelques détails sur la méthodologie employée (voir le texte pour plus de détails).

Ainsi, suite au traitement de nos FMRPSII au mercure ou aux autres modificateurs (voir section précédente), on ajoute à la suspension (15 à 20  $\mu\text{g Chl/ml}$ ) un aliquot de DCBQ pour obtenir une concentration de 400  $\mu\text{M}$  DCBQ. Sous agitation, à 22°C, on laissera équilibrer pendant 30 s. On illuminera ensuite l'échantillon avec une source lumineuse de type "LED" (light emitting diode), d'une intensité de 300  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$  et de couleur rouge ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ). L'électrode étant reliée à un amplificateur et un enregistreur, on pourra suivre graphiquement la production d'oxygène en fonction du temps. En absence de mercure, le taux de dégagement d'oxygène sur nos préparations était en moyenne de  $395 \pm 40 \mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl} \cdot \text{h}$ .

#### 2.4.3- Mesure et analyse de la fluorescence

Au cours de la photosynthèse, suite à l'absorption lumineuse, la chlorophylle excitée à l'état singulet (voir section 1.1.3.2) peut retourner à son état fondamental et dissiper l'excès d'énergie de plusieurs façons: par une conversion photochimique (transfert d'électrons), par dissipation non-radiative (thermique), par transfert d'excitation aux molécules avoisinantes (excitons) et par émission de lumière (fluorescence) (Etienne et Lavorel, 1977) (voir **figure 1 1**). Ces mécanismes sont compétitifs. Ainsi, en suivant l'émission de fluorescence d'une préparation photosynthétique, étant donné la complémentarité des phénomènes, on est en mesure d'obtenir de l'information sur son activité photochimique. En effet, il a été clairement démontré que l'émission de fluorescence d'une feuille ou d'une algue unicellulaire est influencée directement ou indirectement, par les événements survenant au cours de la photosynthèse (Pour des revues voir: Krause et Weis, 1984; Krause et Weis, 1991; Lavorel et Etienne, 1977; Govindjee et Satoh, 1986). La fluorescence émise à la température de la pièce origine principalement du PSII (Duysens et Sweers, 1963). Ce signal d'émission de



fluorescence appelé "effet Kautsky" est très bien caractérisé (voir Krause et Weiss, 1984; Govindjee et Satoh, 1986) et est largement utilisé pour l'étude de l'influence de divers agents chimiques ou physiques sur la photosynthèse (Karukstis, 1991). Dans le cas qui nous concerne, Popovic, Carpentier et Morin (1988) ont analysé la cinétique d'émission de fluorescence sur des FMRPSII en présence de divers additifs; ils ont montré que le transport d'électrons sur ces préparations est hautement préservé et que les mesures de fluorescence variable constituent un outil appréciable pour l'étude du transport d'électrons sur de telles préparations.

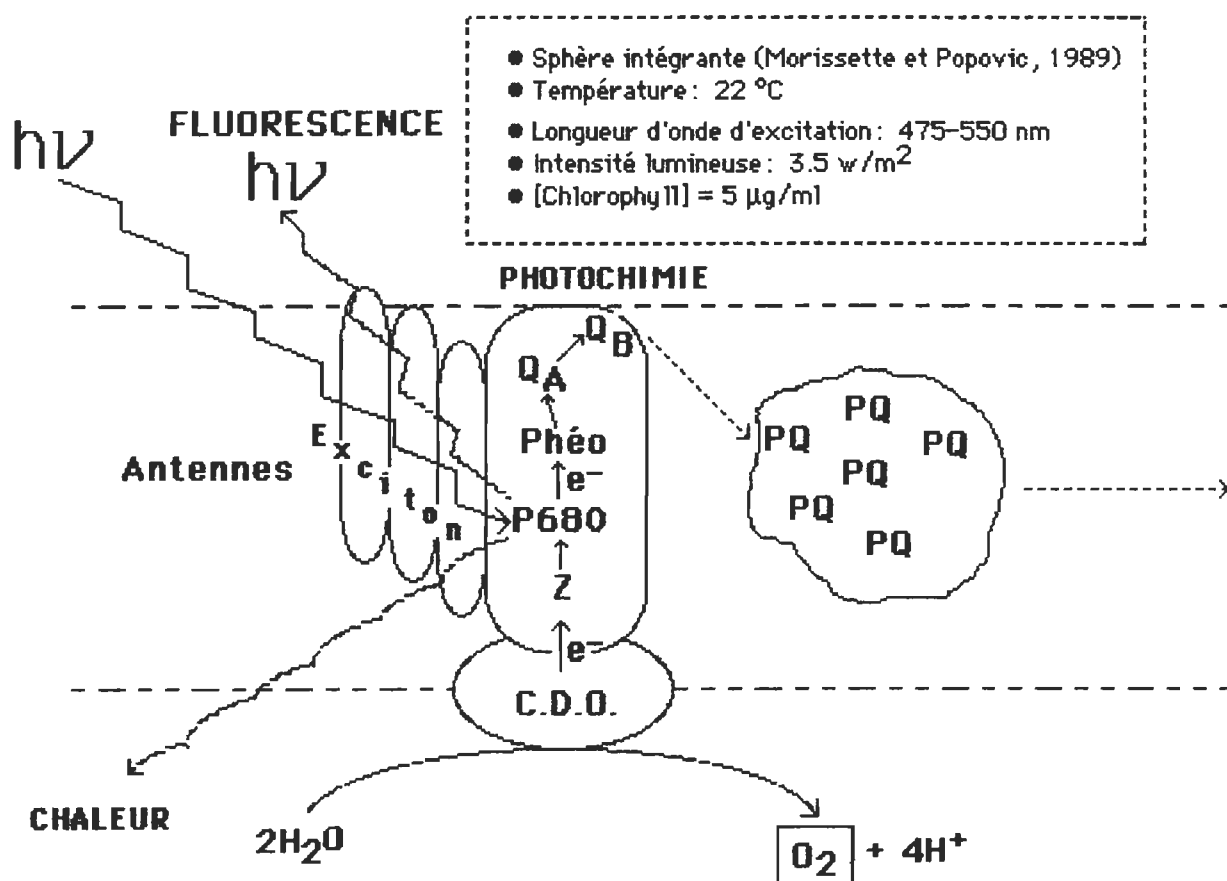


Figure 11. Représentation schématique de la dissipation d'énergie au niveau du PS II et détails de la méthodologie pour les mesures d'induction de fluorescence.

Pour la présente étude, les mesures d'induction de fluorescence ont été effectuées à l'aide d'un fluorimètre à sphère intégrante (Morissette, 1991; Morissette, Meunier et Popovic, 1988). Les échantillons adaptés à l'obscurité et préalablement traités sont illuminés par une lumière verte (475 nm à 550 nm) d'une intensité de  $3.5 \text{ W/m}^2$  (lumière polychromatique filtrée par les filtres CS 4-96 (Bandes passantes (B.P.) = 400-600 nm) et CS 3-71 (B.P.= 470-560 nm). La fluorescence émise est captée par un détecteur optique Devar 539-01-5 après une sélection de la fluorescence à l'aide des filtres optiques CS-2-64 (B.P.= 640-700 nm) et CS-7-59 (B.P.= 300-480 nm). Le signal isolé de la fluorescence est ensuite pré-amplifié et acheminé à un oscilloscope analogue digital (Northwest Instrument Systems Scope-85). Les données sont ensuite enregistrées sur micro-ordinateur (Apple IIe) et analysées numériquement. L'intensité de la fluorescence présente deux composantes: une fluorescence variable ( $F_v$ ) et une fluorescence constante ( $F_o$ ). Pour distinguer ces deux composantes, le niveau  $F_o$  est estimé par extrapolation à l'ordonnée de la première portion (premières 20 ms) de la courbe de fluorescence selon une méthode mise au point par Morissette et Popovic (1987). Les mesures sont effectuées à la température de la pièce. Le milieu d'incubation contient: 400 mM sucrose, 20 mM Mes-TMAOH, pH 6,3 et la concentration de Chl est de  $5 \mu\text{g/ml}$ . On notera qu'aucun accepteur artificiel d'électrons n'est utilisé pour ce type d'analyse ce qui rend cette approche très intéressante. Malgré des contrôles rigoureux lors des mesures de dégagement d'oxygène, il y a toujours un risque d'interaction entre le modificateur utilisé ( $\text{HgCl}_2$ , NEM ou autre) et l'accepteur d'électron (DCBQ ou autre). Lors des mesures de fluorescence, ce risque est éliminé. Une comparaison des deux méthodes d'analyse nous permettra d'obtenir une vision juste de l'état fonctionnel du PS II.

Des courbes d'induction de fluorescence typiques pour un organisme photosynthétique entier et pour les FMRPSII sont représentées à la figure 12. Il est établi que la

fluorescence de la Chl *a in vivo* est contrôlée par l'état d'oxydoréduction de  $Q_A$ , le premier accepteur d'électron du PS II (Duysens et Sweers, 1963). Le rendement de fluorescence est élevé lorsque  $Q_A$  est réduit et est faible lorsque  $Q_A$  est oxydé. Au cours de la photosynthèse, plusieurs phénomènes viendront modifier l'état d'oxydo-réduction de  $Q_A$ . Le **tableau 8** résume ces événements tels que décrits par Govindjee et Satoh (1986). Il ne s'agit ici que d'une description sommaire, ces phénomènes étant fort complexes et n'étant que partiellement élucidés. Il est à noter que la fluorescence au niveau O est émise par les chlorophylles antennes pendant le transfert de l'exciton vers le centre réactionnel. Cette fluorescence est instantanée et indépendante de la photochimie du PS II, mais peut être affectée par des stress environnementaux (Briantais et coll., 1986; Krause et Weiss, 1984; Karukstis, 1991). On la nomme fluorescence constante ou initiale ( $F_o$ ). La fluorescence variable ( $F_v$ ) correspond à la montée de fluorescence au delà de  $F_o$  et dépendra de l'état d'oxydoréduction de  $Q_A$ . L'état d'oxydation de  $Q_A$  varie en fonction de certains événements survenant au PS II mais aussi d'autres phénomènes survenant ailleurs dans le chloroplaste (PS I, ATP synthétase, cycle de Calvin) (voir le **tableau 8**). On notera que les courbes obtenues sur un organisme entier et sur des FMRPSII seront différentes. Entre autres, on ne retrouve pas le déclin ID chez les FMRPSII, ce dernier correspond à une réoxydation de  $Q_A$  par le PS I et ces préparations en sont dépourvues presque entièrement. De plus, les variations survenant à des temps plus longs (au delà de P), sont influencées par des événements survenant au delà du PS II (voir **tableau 8**), et ne sont donc pas observées sur des FMRPSII. On obtient donc rapidement un niveau maximal de fluorescence où tous les  $Q_A$  sont réduits, les électrons étant accumulés au PS II.

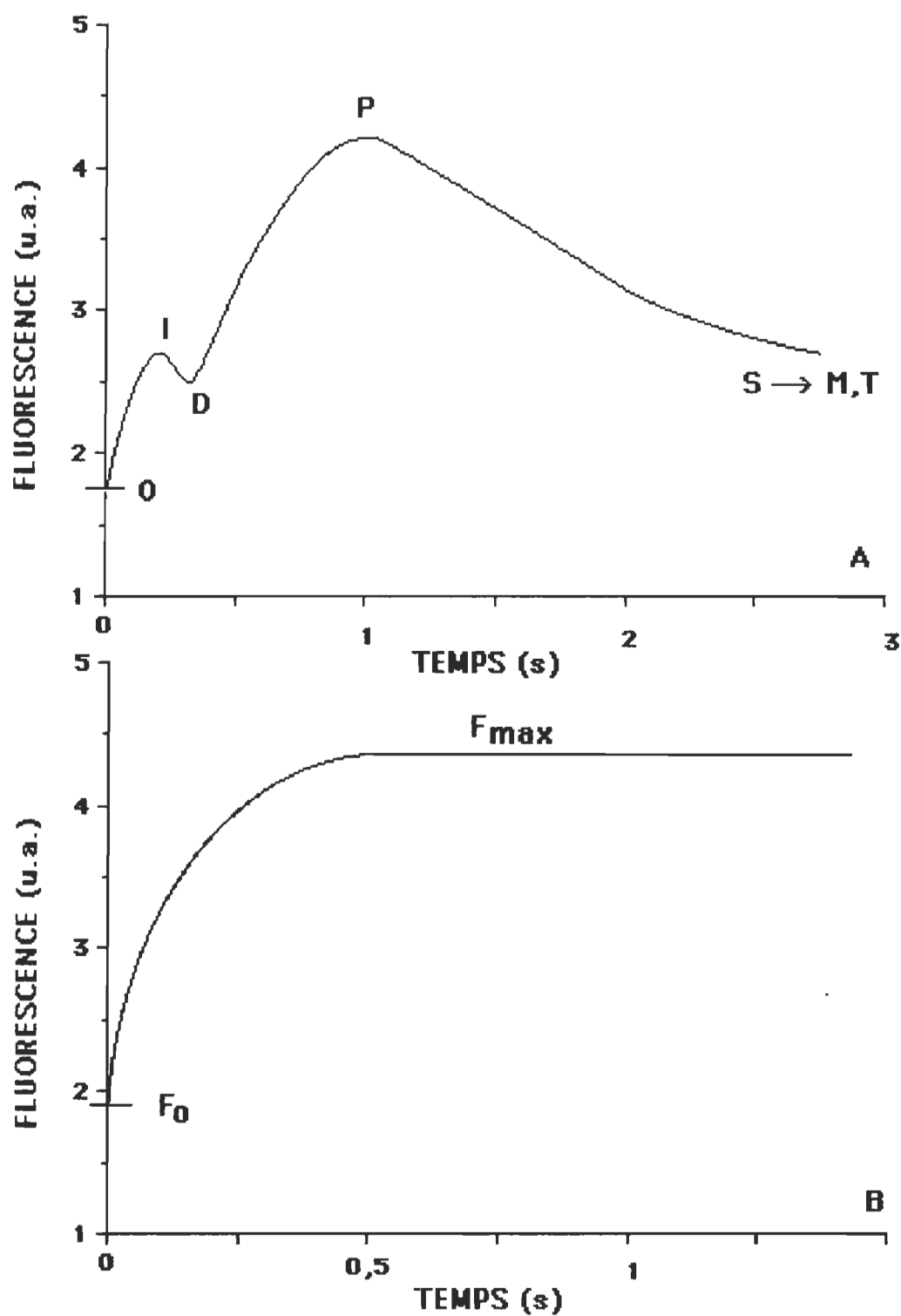


Figure 12. Courbes typiques d'induction de fluorescence pour (A) un organisme entier ou (B) des FMRPSII (voir le texte pour l'explication des paramètres).

**Tableau 8**  
**Explications de la courbe d'induction de fluorescence**

Niveau de fluorescence	Interprétation courante
Niveau O	Perte d'énergie d'excitation des chlorophylles antennes au cours du transfert aux centres réactionnels
Montée OI	Réduction de $Q_A$ en $Q_A^-$ par le PS II
Déclin ID	Reoxydation de $Q_A^-$ en $Q_A$ par le PS I
Montée DP	Accumulation d'équivalents réducteurs dans la chaîne de transport d'électrons jusqu'au PS I.
Déclin PS	Réoxydation de $Q_A^-$ par divers mécanismes (complexe)
Montée SM	Indépendante de l'état d'oxydo-réduction de $Q_A$ : 1- effet du changement de pH sur le transport d'électron 2- régulation par les réactions du cycle de Calvin
Déclin MT	Indirectement lié à la synthèse d'ATP et son utilisation; changements structurels.

D'après Govindjee et Satoh, 1986.

Au cours du présent travail, les paramètres qui seront estimés au cours des mesures de fluorescence sur les FMRPSII seront les suivants:

$F_o$  : Fluorescence constante ou initiale (extrapolation à l'ordonné des premières 20 ms)

$F_{max}$ : Fluorescence maximale (niveau maximal de fluorescence obtenu)

$F_{vmax}$ : Fluorescence variable maximale ( $F_{max} - F_o$ )

## 2.5- Matériel

Tableau 9

Liste des produits et appareils utilisés

ARTICLE	CARACTÉRISTIQUES	FOURNISSEUR
<b><u>PLANTES:</u></b>		
Épinards	Feuilles de <i>Spinacea oleracea</i>	Marchand local
Orge	Graines de <i>Hordeum vulgare</i>	Agriculteur local
<b><u>APPAREILS:</u></b>		
Centrifugeuses	Sorvall RC-5B - Refrigerated Superspeed	Dupont Instruments
	Microcentrifuge 235C	Fisher
Électrophorèse	Mighty small miniature slab gel electrophoresis unit - SE200	Hoefer Scientific Instruments
	Générateur de courant: LKB 2303 Multidrive XL - 3.5 kV	Pharmacia LKB Bio-technology
	Densitomètre LKB Ultro Scan XL	Pharmacia LKB Bio-technology
	Programme Gel Scan XL 2.1	Pharmacia LKB Bio-technology
Fluorimètre	Sphère intégrante	Confection maison
	Source lumineuse:	
	Filtres optiques: CS 4-96, CS 3-71, CS-2-64, CS-7-59	Corning
	Détecteur optique Devar 539-01-5	Devar
	Oscilloscope digital Scope-85	Northwest Instrument Systems
	Micro-ordinateur Apple IIe	Apple

Tableau 9 (suite)

ARTICLE	CARACTÉRISTIQUES	FOURNISSEUR
Dégagement d'oxygène	Boîtes de contrôle: O <sub>2</sub> Control Box CB1-D Light source control LC1	Hansatech Hansatech
	Électrode: Hansatech S1 electrode disk	Hansatech
	Source lumineuse: Hansatech LED light source LH7 (300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-2}$ ; $\lambda=660 \text{ nm}$ )	Hansatech
	Ensemble Membrane et KCl YSI 577S	Yellow Spring Instruments
<b>RÉACTIFS</b>		
DCBQ	2,5 Dichloro-p-benzoquinone	Kodak
HgCl <sub>2</sub>	Chlorure de mercure	Sigma
Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Nitrate de mercure	Aldrich
DTT	Dithiothreitol	Sigma
NEM	n-éthylmaléimide	Sigma
PCMBS	acide p-chloromercuphenyl-sulfonique	Sigma
Bleu de Coomassie	R-250	Sigma
Acrylamide		LKB

Les autres produits (tampons, sels, détergents) sont de la plus haute qualité disponible commercialement

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

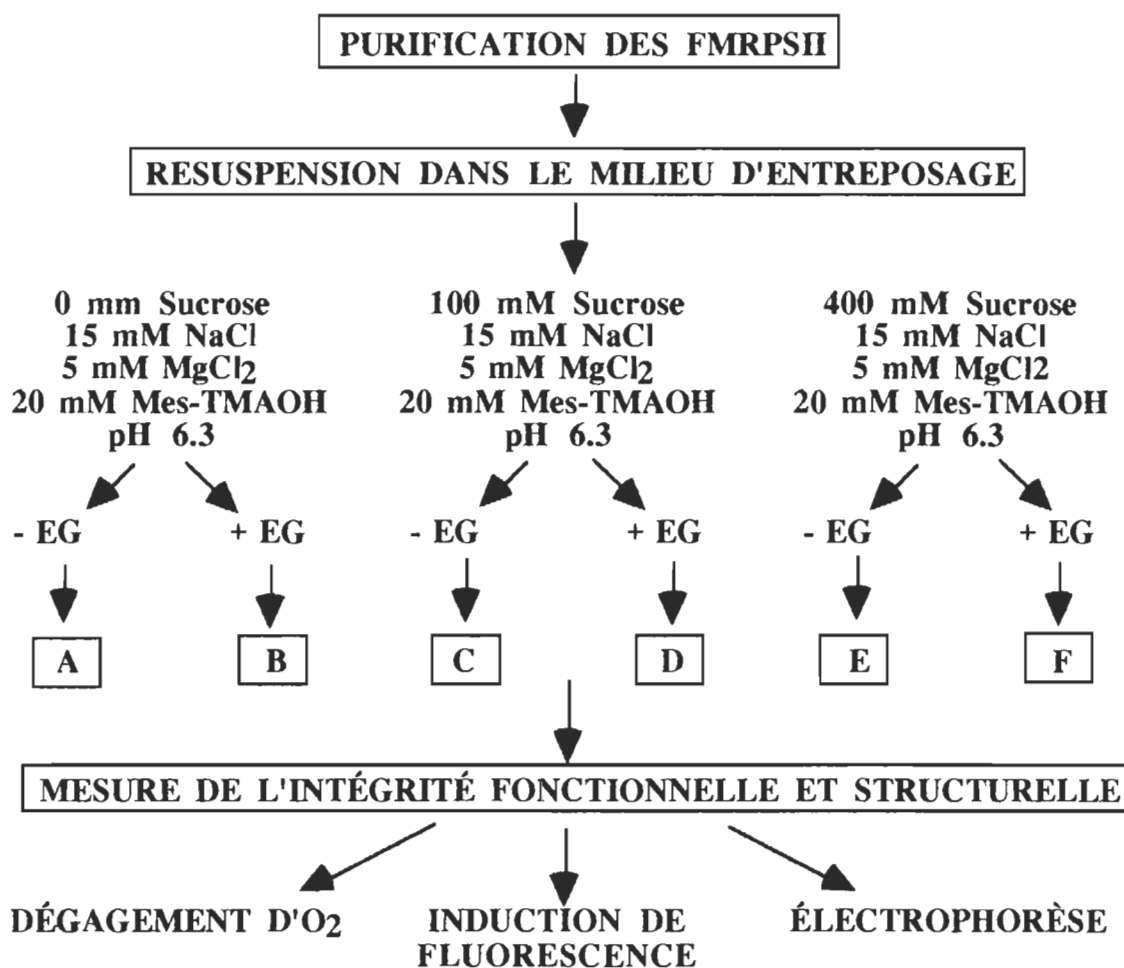
#### 3.1- Mise au point de la méthode de préservation des FMRPSII

En consultant la littérature existante, on note rapidement qu'il existe une grande variété de milieux utilisés pour l'entreposage des FMRPSII dans l'azote liquide; allant d'un simple tampon jusqu'à des milieux plus complexes contenant sels, tampon et divers agents cryoprotecteurs tels le sucrose et l'éthylène glycol (Berthold, Babcock et Yocum, 1981; Dunahay et coll., 1984; Miyao et Murata, 1983b; Ghanotakis et coll., 1984). Il était assez difficile de faire un choix judicieux à la simple consultation de la littérature, très peu de détails étant donnés sur les raisons ayant motivé le choix d'un milieu ou d'un autre. La première partie de notre étude a donc été de déterminer les conditions optimales d'entreposage de notre matériel d'étude pour faire en sorte que l'intégrité structurelle et fonctionnelle des FMRPSII soit maintenue suite à un entreposage plus ou moins long dans l'azote liquide. La méthodologie expérimentale et la composition des milieux d'entreposage étudiés sont décrites dans la **figure 13**.

Six catégories de milieux ont été utilisées, ils sont identifiés par les lettres A à F. Tous les milieux contiennent un tampon Mes-NaOH à 20 mM, pH 6.3; 15 mM NaCl et 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Ces composantes apparaissant assez uniformément dans la littérature (Berthold, Babcock et Yocum, 1981; Dunahay et coll., 1984; Miyao et Murata, 1983b; Ghanotakis et coll., 1984). Ce qui a varié d'un milieu à l'autre sont d'abord: la présence ou l'absence de



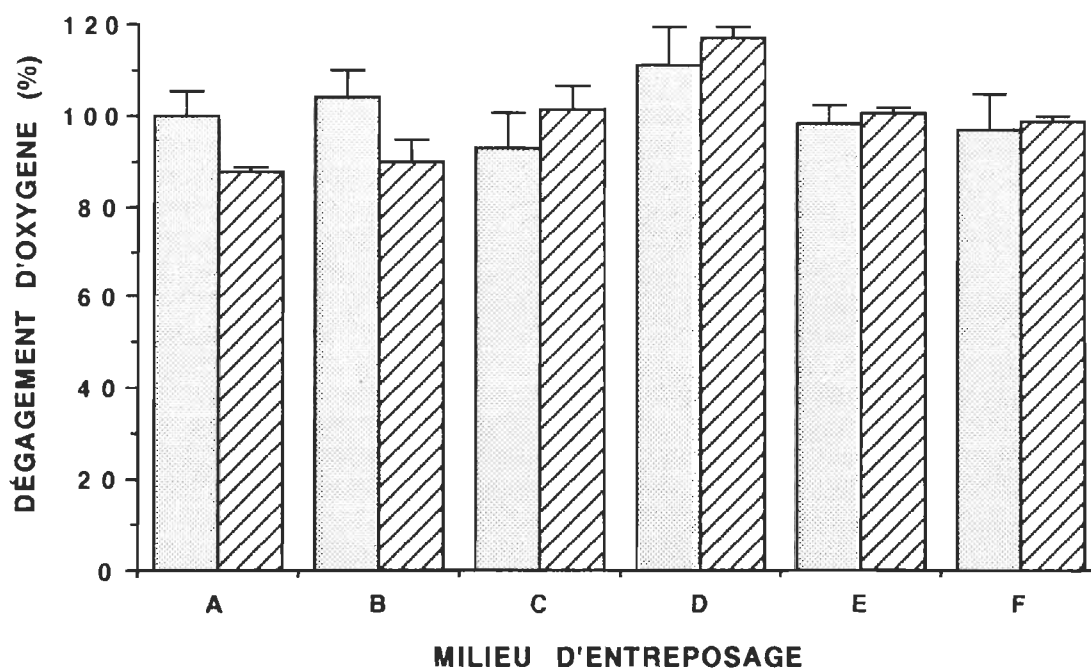
sucrose (0, 100 mM ou 400 mM Sucrose) et la présence ou l'absence d'éthylène glycol (30% v/v). Suite à la dernière centrifugation lors de la préparation des FMRPSII, ces derniers étaient resuspendus dans les divers milieux d'entreposage, congelés dans l'azote liquide pour 3 heures et ensuite des analyses fonctionnelles (dégagement d'oxygène et induction de fluorescence) et structurales (électrophorèse) ont été effectuées pour vérifier l'intégrité du matériel d'étude en comparaison avec le matériel frais.



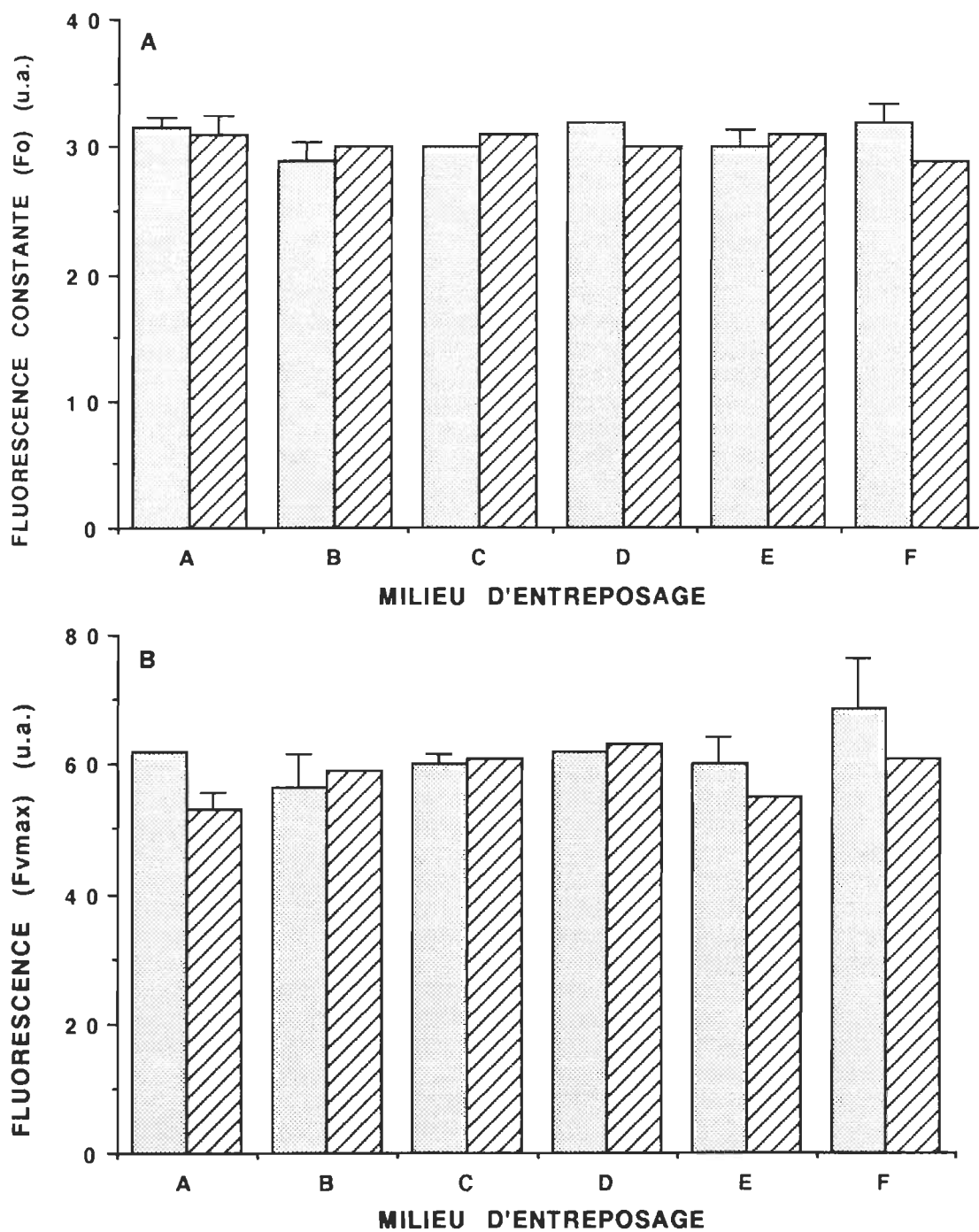
**Figure 13:** Méthodologie expérimentale et description des milieux d'entreposage étudiés pour la mise au point de la méthode de préservation.

La **figure 14** montre l'activité de dégagement d'oxygène des FMRPSII qui ont été resuspendus dans les différents milieux d'entreposage. Une mesure était effectuée sur le matériel frais et une autre sur le matériel ayant été congelé trois heures dans l'azote liquide. Les seules différences significatives sont observées pour les milieux d'entreposage A et B, milieux ne contenant pas de sucrose. Dans ces cas, on note une baisse d'activité significative de l'ordre de 15%, qu'il y ait ou non présence d'éthylène glycol. Le sucrose et l'éthylène glycol sont deux agents cryoprotecteurs. Il n'est donc pas surprenant de constater que pour le milieu A, ne contenant ni sucrose ni éthylène glycol, il y ait une certaine baisse d'activité suite à la congélation. Cependant, on note pour le milieu B, malgré la présence d'éthylène glycol, une baisse d'activité du même ordre qu'en A. L'éthylène glycol dans ce cas-ci ne semble pas jouer de rôle cryoprotecteur. Pour les milieux C,D,E,F, la présence de sucrose (100 mM ou 400 mM) permet de préserver l'intégrité fonctionnelle des FMRPSII. La présence supplémentaire d'éthylène glycol ne semble pas modifier l'activité des FMRPSII.

Les mesures de fluorescence permettent aussi d'évaluer l'intégrité fonctionnelle des FMRPSII. Deux paramètres ont été évalués:  $F_o$  et  $F_{vmax}$ . Le premier paramètre  $F_o$  correspond à la fluorescence initiale et n'est pas associé à la photochimie du PS II. La valeur de  $F_o$  correspond plutôt à l'énergie perdue par les antennes lors du transfert d'excitons vers le centre réactionnel (Krause et Weiss, 1984; voir section 2.4.3 pour plus de détails). Une altération des complexes collecteurs de lumière aurait des conséquences sur la valeur de  $F_o$ . On peut voir à la **figure 15A**, que la congélation des FMRPSII n'affecte en rien  $F_o$  quelque soit le milieu d'entreposage utilisé. Le second paramètre évalué est  $F_{vmax}$ .  $F_{vmax}$  correspond à la valeur maximale de fluorescence à laquelle on a soustrait la valeur de  $F_o$ , ce qui correspond à la fluorescence variable d'origine photochimique. On remarque à la **figure 15B**, une faible atténuation de la fluorescence uniquement pour le milieu A.



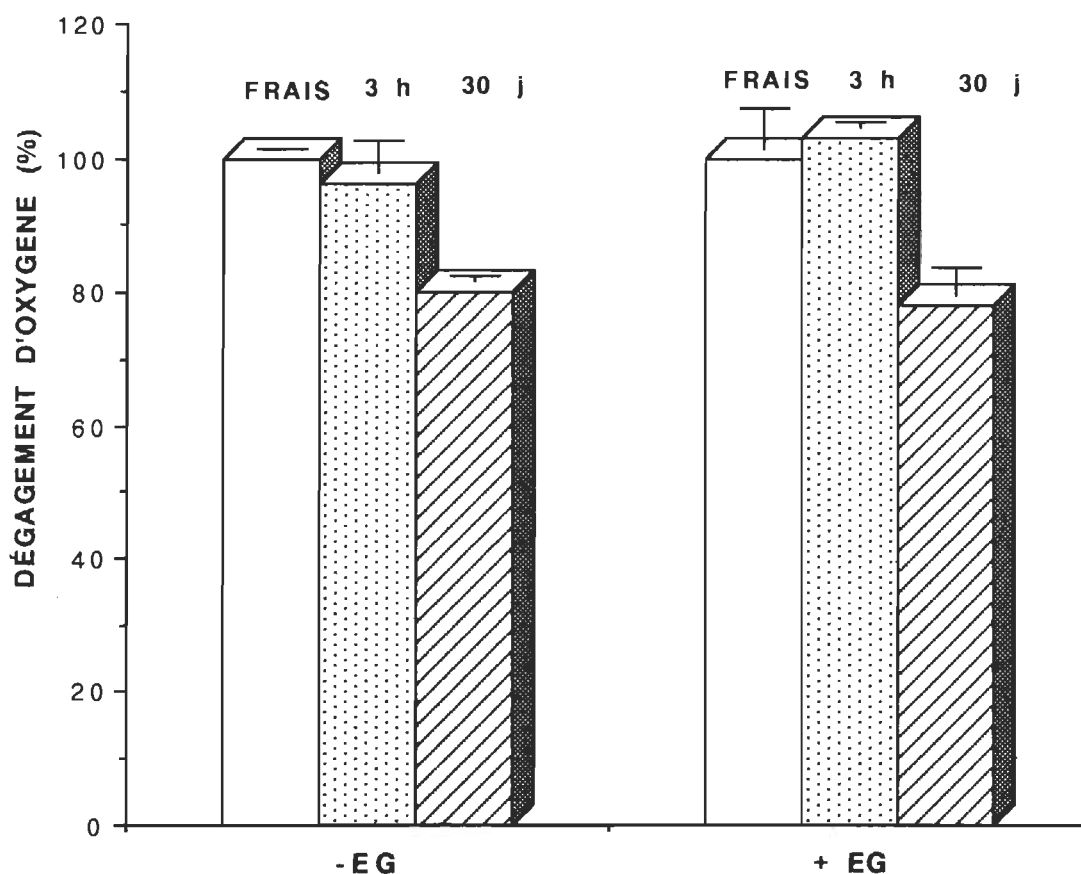
**Figure 14.** Effet du milieu d'entreposage sur l'activité de dégagement d'oxygène des FMRPSII frais (■) ou congelés dans l'azote liquide (▨). La composition des milieux d'entreposage est décrite à la figure 13. L'activité de dégagement d'oxygène a été mesurée selon la procédure décrite dans la section matériel et méthodes.



**Figure 15:** Effet du milieu d'entreposage sur l'intensité de fluorescence constante (Fo) (A) et de fluorescence variable (Fvmax) (B) émise par les FMRPSII frais (■) ou congelés dans l'azote liquide (▨). La composition des milieux d'entreposage est décrite au tableau X.

Une atténuation (quenching) de la fluorescence peut être attribuable à plusieurs phénomènes chez les organismes entiers, sur les chloroplastes ou sur les thylacoïdes: variation de pH liée à la formation du gradient de proton de part et d'autre de la membrane du thylacoïde; atténuation dépendante de l'ATP relié à la phosphorylation des CCL; atténuation liée à la photoinhibition ; atténuation par les hautes températures (dont des dommages au complexe de dégagement d'oxygène) et atténuation physiologique (tel que décrit au **tableau 8**) (d'après Krausse et Weiss, 1984). Plusieurs de ces phénomènes ne peuvent expliquer une atténuation de fluorescence sur nos préparations de FMRPSII si on considère que nous sommes en présence de fragments membranaires dépourvus de PSI et d'ATP synthétase entre autres. Une atténuation de la fluorescence sur nos préparations peut être causée par des dommages au côté donneur du PS II. Dans ce cas, l'arrivée d'électrons au centre réactionnel est limitée, ce qui diminue la photoréduction de  $Q_A$  et proportionnellement l'émission de fluorescence. On se rappelle que le rendement de fluorescence est élevé lorsque  $Q_A$  est réduit. La seule atténuation de fluorescence significative, mais mineure, a été observée pour le milieu A, ce dernier ne contient aucun agent cryoprotecteur, ni sucrose, ni éthylène glycol. Ce phénomène a aussi été observé pour le dégagement d'oxygène. Il est probable que dans ce cas, une altération du côté donneur du PS II soit survenue. Des dommages au côté accepteur demeurent aussi probables. L'émission de fluorescence lorsque les FMRPSII sont préservés dans le milieu B n'a pas été modifiée, contrairement au dégagement d'oxygène où une perte d'activité d'environ 15% a été observée. Cette différence est difficile à expliquer mais il ne s'agit pas ici d'une différence majeure. La conclusion la plus importante à tirer à la lueur de ces études de dégagement d'oxygène et de fluorescence est que pour tous les milieux contenant du sucrose, l'activité de dégagement d'oxygène a été préservée. La présence supplémentaire d'éthylène glycol, suite à un court séjour dans l'azote liquide (3 h) ne semble pas jouer un rôle majeur. La seule présence d'éthylène glycol, sans sucrose, n'a pas préservé l'activité de dégagement d'oxygène.

Une autre mesure importante a été de vérifier l'intégrité des FMRPSII en fonction du temps d'entreposage. Compte-tenu des résultats mentionnés ci-haut, les milieux E et F ont été utilisés, c'est-à-dire les milieux contenant 400 mM sucrose, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Mes-TMAOH, pH 6.3 avec ou sans éthylène glycol. La présence de sucrose semble suffisante pour préserver l'intégrité des PS II pour un court séjour (3 heures) dans l'azote liquide. Une concentration de 400 mM sucrose a été choisie étant donné que cette concentration permet de maintenir l'osmolarité du milieu près de la réalité physiologique. L'éthylène glycol, ne semble pas jouer un rôle cryoprotecteur supplémentaire lors d'un court séjour dans l'azote liquide, mais il est important de vérifier pour ce qui est d'un séjour prolongé. La **figure 15**, montre qu'après un séjour d'un mois dans l'azote liquide les FMRPSII n'ont perdu que 20% de leur activité de dégagement d'oxygène que ce soit en présence ou en absence d'éthylène glycol. Ainsi, pour toutes nos études ultérieures, le milieu E sera utilisé et les FMRPSII seront utilisés à l'intérieur d'un délai d'un mois. Les résultats démontrent que nous pouvons sans inquiétude omettre d'ajouter de l'éthylène glycol. Cet agent cryoprotecteur est très pénétrant, et augmente la fluidité membranaire (Finkle et coll., 1985). En l'éliminant de notre milieu d'entreposage, on évite d'interagir avec la membrane et de possiblement modifier artificiellement sa réaction au mercure ou aux autres agents à l'étude.



**Figure 16:** Intégrité fonctionnelle des FMRPSII en fonction du temps d'entreposage dans l'azote liquide en absence (-EG) ou en présence (+EG) d'éthylène glycol.

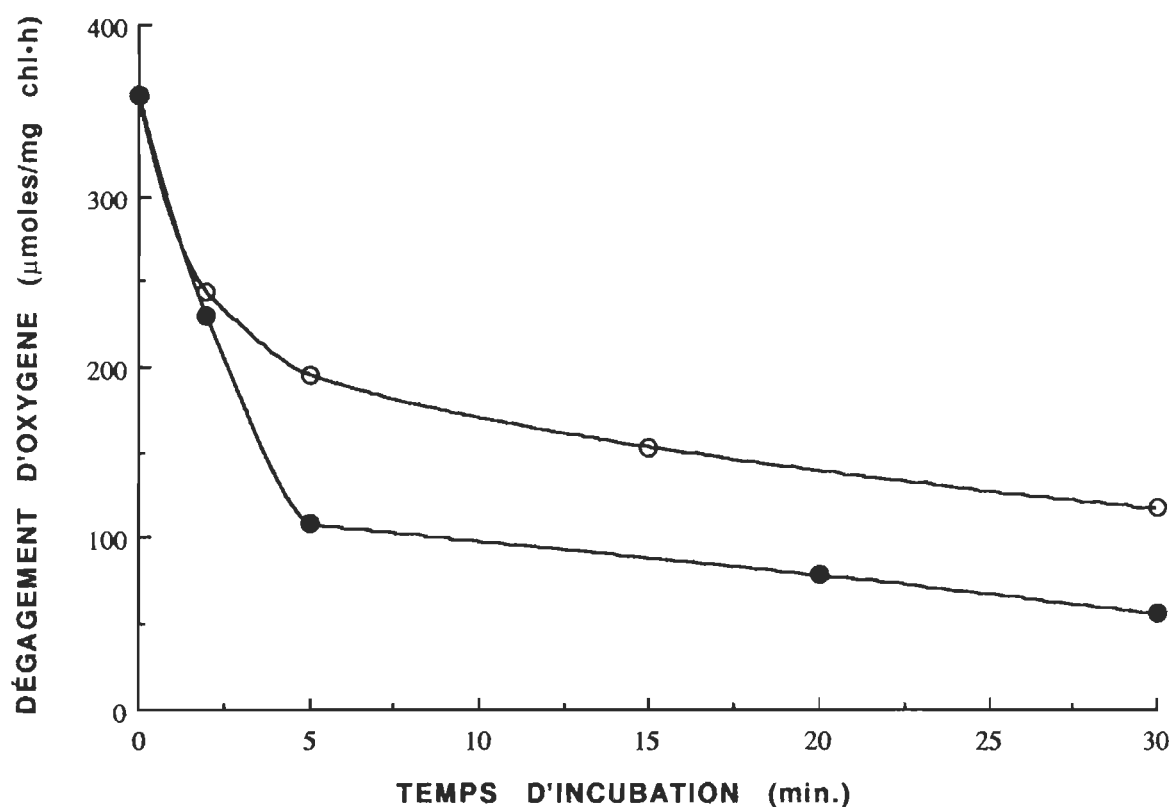
Il est intéressant de noter dans cette étude que l'éthylène glycol, un agent cryoprotecteur largement utilisé, n'a pas montré d'effet cryoprotecteur supplémentaire au sucrose sur nos types de préparations. Le sucrose et l'éthylène glycol sont des agents qui offrent une cryoprotection colligative (Finkle et coll., 1985). Leur principale fonction est de diminuer la température de fusion (ou de congélation) et la température de nucléation homogène; en fait, la présence de ces solutés retarde la formation de cristaux de glace qui pourraient endommager le matériel biologique à congeler. Cependant, ces deux agents présentent une perméabilité différente et exerceront leur action quelque peu différemment. En effet,

l'éthylène glycol est un agent très pénétrant, il pourra pénétrer dans des structures fermées (cellules, vésicules, etc.) et augmentera ainsi la concentration interne en soluté, ce qui diminuera les chances de formation de cristaux tant à l'intérieur qu'à l'extérieur d'une cellule et limitera les changements de volume cellulaire pouvant survenir au cours du cycle congélation - décongélation. Le sucrose est moins pénétrant, son action cryoprotectrice s'exerce différemment à l'extérieur ou à l'intérieur d'une structure fermée: à l'extérieur, la présence de sucrose retarde la formation de cristaux mais exerce une pression osmotique sur la cellule qui tend à perdre de l'eau, son volume diminuera et sa concentration interne augmentera indirectement, et la formation de cristaux intracellulaire sera ainsi retardée. On note cependant ici que des changements de volume cellulaire peuvent survenir et occasionner des dommages ultrastructuraux. Par contre, il a été démontré que les sucres (sucrose, raffinose, glucose) augmentent la stabilité membranaire. Dans la présente étude, il semble que l'éthylène glycol n'offrait aucune protection supplémentaire à celle offerte par le sucrose (voir **figure 14**). Les FMRPSII contrairement aux cellules, aux chloroplastes ou aux thylacoïdes ne sont pas des structures osmotiquement actives, ce sont des fragments membranaires ne formant pas de structures vésiculaires fermées (Dunahay et coll., 1984). Ainsi, les avantages osmotiques que procure l'éthylène glycol n'entrent probablement pas en jeu lors de la congélation des FMRPSII et la protection offerte par le sucrose en retardant la formation de cristaux dans le milieu environnant les FMRPSII et en stabilisant la membrane semblent largement suffisantes. Comme mentionné précédemment, le fait de pouvoir éviter d'utiliser l'éthylène glycol constitue un net avantage. Compte-tenu de la grande perméabilité de cet agent, nous nous assurons ici d'éviter des interactions non spécifiques avec la membrane qui pourraient modifier sa réactivité au mercure ou aux autres agents étudiés. (Ces notions de cryobiologie sont tirés de Finkle et coll., 1985 et Meryman et Williams, 1985). Une fois les conditions optimales de travail déterminées, passons maintenant à l'étude proprement dite.



### 3.2- Effets du mercure sur l'intégrité fonctionnelle du PS II

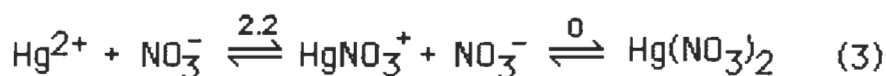
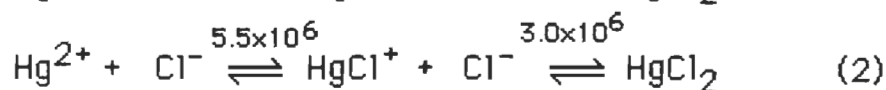
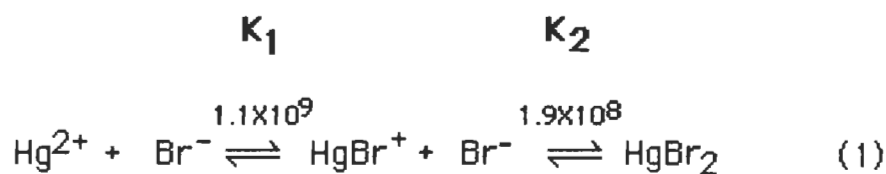
La première étude fonctionnelle a porté sur l'effet du mercure sur l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'incubation. Comme le montre la **figure 17**, le mercure exerce rapidement une action inhibitrice sur l'activité du PS II. Déjà après 5 minutes d'incubation, le mercure a largement inhibé l'activité de dégagement d'oxygène de nos préparations et ce pour les deux concentrations de  $\text{HgCl}_2$  utilisées. Par exemple, pour une concentration de  $40\ \mu\text{M}$ , on observe 71% d'inhibition de l'activité après 5 minutes et après 30 minutes, nous observons seulement une inhibition supplémentaire de 8%.



**Figure 17.** Effet du mercure sur l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps. Les concentrations de  $\text{HgCl}_2$  utilisées sont de  $20\ \mu\text{M}$  (○) et de  $40\ \mu\text{M}$  (●).

À la lueur de ce premier résultat, on note que le mercure est un puissant inhibiteur du PS II. En effet, une concentration aussi faible que 40  $\mu\text{M}$  inhibe 80% de l'activité en 30 minutes. De plus, on note que le mercure exerce rapidement son action sur le PS II, on est presque à saturation de l'effet après 5 minutes d'incubation. Pour les études ultérieures, un temps d'incubation de 5 minutes sera utilisé. Ce qui représente un net avantage, car les préparations contrôles (en absence de mercure) ont perdu très peu d'activité après 5 minutes à la température de la pièce (environ 5% de perte d'activité). Nous sommes donc assurés de l'intégrité de notre matériel d'étude.

Une étude en fonction de la concentration de mercure est présentée à la **figure 18** et ce pour deux sels de mercure différents, le  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  et le  $\text{HgCl}_2$ . On observe que les deux sels inhibent fortement le dégagement d'oxygène; le nitrate de mercure d'une façon plus intense. En effet, la concentration de mercure requise pour inhiber 50% du dégagement d'oxygène est de 2.5  $\mu\text{M}$  en présence de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  et de 10  $\mu\text{M}$  en présence de  $\text{HgCl}_2$ . Cette différence peut être attribuable aux propriétés de dissociation des deux sels en solution. En effet, si on tient compte des constantes de stabilité (inverse des constantes de dissociation), on se rend compte que le  $\text{HgCl}_2$  est retrouvé en solution principalement sous sa forme complexée et que le  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  se retrouve principalement sous forme dissociée (voir les équations 2 et 3 ci-dessous) (Ringbom, 1967). Le mercure étant plus réactif sous sa forme ionisée, il est consistant d'observer une plus forte inhibition par le  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ .



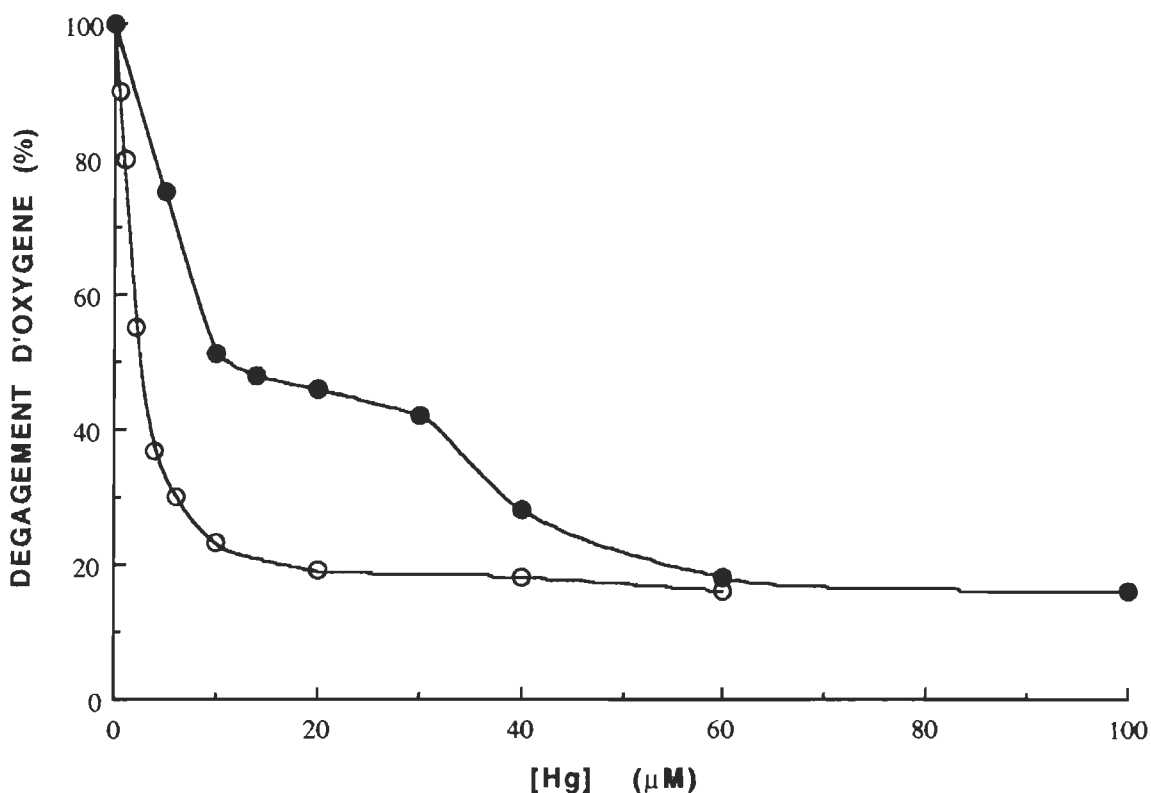
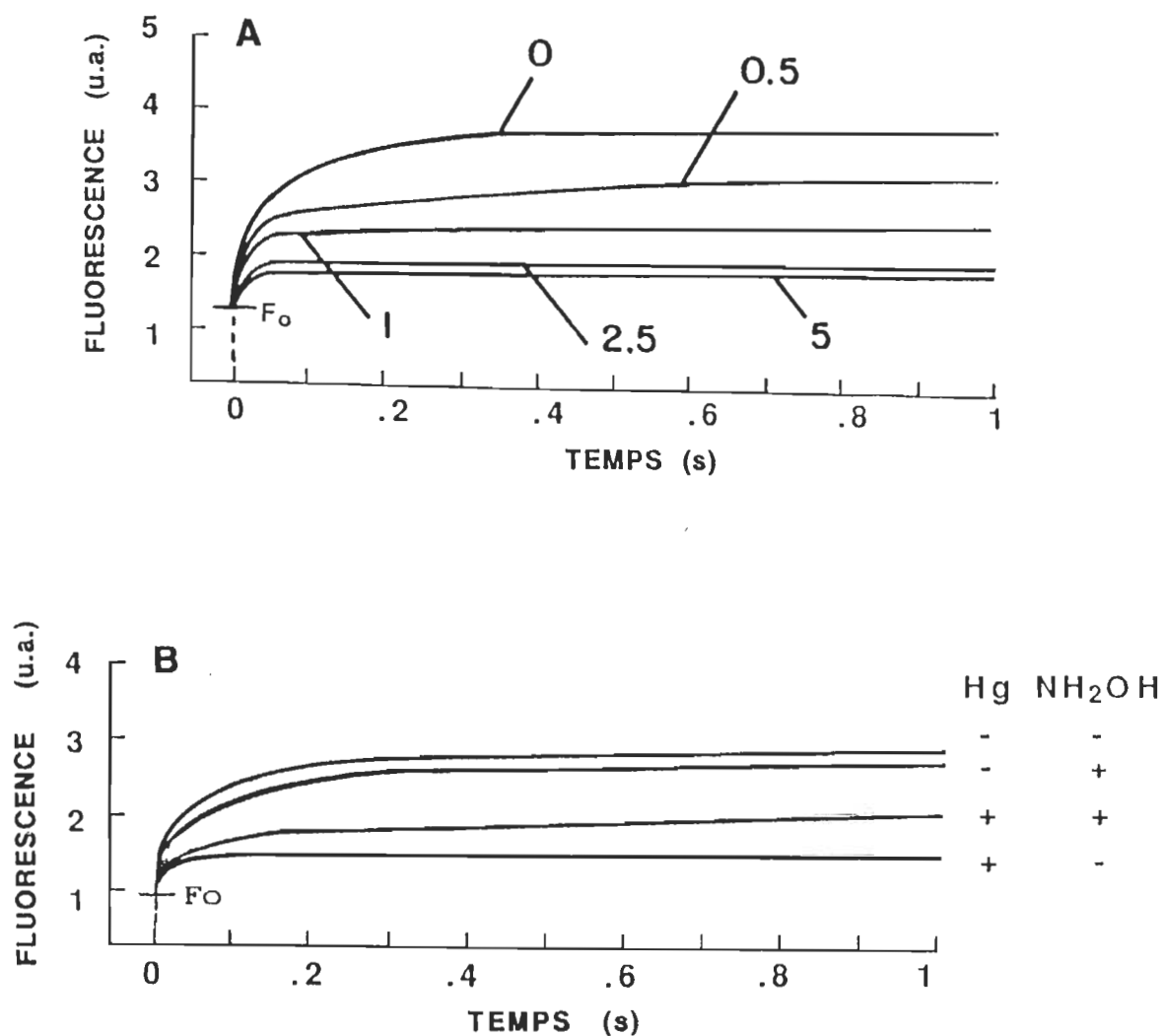


Figure 18. Effet du mercure sur l'activité de dégagement d'oxygène en fonction de la concentration de deux sels de mercure:  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  (○) et  $\text{HgCl}_2$  (●). Les FMRPSII ont été incubés pendant 5 minutes aux concentrations indiquées de mercure.

Enfin, les deux sels de mercure ont causé la même inhibition maximale aux plus fortes concentrations, ce qui indique que le mercure est l'agent inhibiteur. Dans l'ordre de concentration utilisé ( $\mu\text{M}$ ), il a déjà été démontré que ces deux co-anions ( $\text{Cl}^-$  et  $\text{NO}_3^-$ ) n'ont pas d'effet sur le PSII, cependant à des concentrations de l'ordre du mM ces anions stimulent l'activité du PSII (Homann, 1988b et voir page 93). De plus, l'inhibition causée par le mercure est irréversible, un lavage et une centrifugation suite au traitement n'ont pas réussi à lever l'inhibition causée par le mercure (Gingras, 1994).

L'effet du mercure sur l'activité du PS II a aussi été estimé par des mesures d'induction de fluorescence.



**Figure 19.** A: Emission de fluorescence des FMRPSII en présence de concentrations croissantes de mercure (les chiffres indiquent la concentration de  $\text{HgCl}_2$  en  $\mu\text{M}$ ). B: Emission de fluorescence des FMRPSII en présence ou en absence de 2.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$  et en présence ou en absence de 5 mM  $\text{NH}_2\text{OH}$ .

La figure 19A montre que des concentrations croissantes de mercure causent une atténuation graduelle de la fluorescence. Plus précisément, la valeur initiale de fluorescence ( $F_0$ ) n'est pas modifiée en présence de mercure, on peut supposer que la transmission des excitons vers le centre réactionnel, via les antennes, n'est pas altérée. Par contre, la fluorescence variable est graduellement atténuée. Sur ce type de préparation, une atténuation de la fluorescence variable indique souvent des dommages sur le côté donneur du PS II. En effet, dans ce cas, l'arrivée d'électrons au centre réactionnel est limitée, ce qui diminue la photoréduction de  $Q_A$  et proportionnellement l'émission de fluorescence. Pour vérifier s'il s'agit d'un effet sur le côté donneur, il est possible d'utiliser un donneur d'électrons qui cédera ses électrons au PS II au delà du complexe de dégagement d'oxygène. L'hydroxylamine, un composé qui inhibe le dégagement d'oxygène en réduisant directement le manganèse, a été utilisé (Cheniae et Martin, 1971). On peut voir que l'effet du mercure est partiellement renversé en présence de ce composé (figure 19B). Il est important de noter que chez les PS II non traités au mercure, l'émission de fluorescence est presque identique en présence ou en absence d'hydroxylamine. Ces résultats indiquent clairement que le mercure exerce totalement ou en partie son effet sur le côté donneur du PS II. La possibilité que le mercure exerce une action sur le côté accepteur n'est pas à exclure, une étude en fonction de la concentration d'hydroxylamine aurait été nécessaire pour vérifier s'il était possible de renverser totalement l'inhibition causée par le mercure.

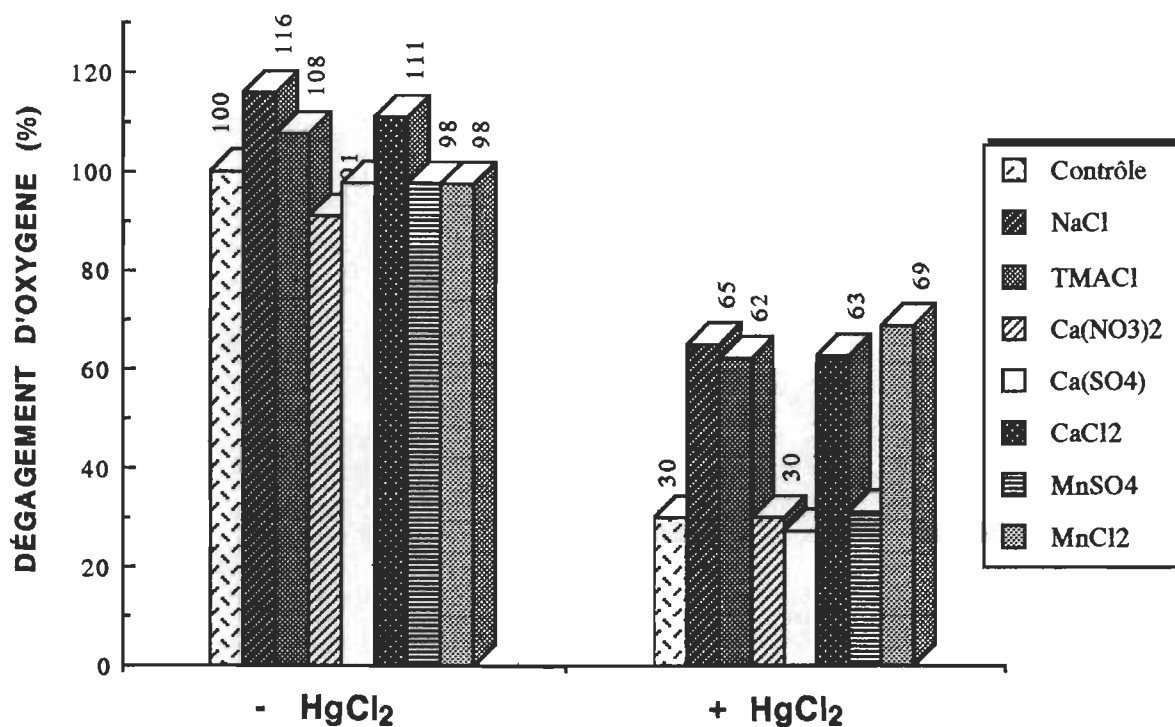
Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Samson (1989) sur l'algue *Dunaliella tertiolecta*. Lors d'études faites *in vivo*, Samson avait aussi démontré que le mercure inhibe le dégagement d'oxygène chez cette algue. Il avait observé des valeurs d'inhibition de 50% pour une concentration de 40  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  après une incubation de 75 minutes. Sur notre matériel d'étude nous obtenons 50% d'inhibition après 5 minutes d'incubation avec une concentration de  $\text{HgCl}_2$  de 10  $\mu\text{M}$ . Ces différences quantitatives

s'expliquent facilement si on considère la simplicité de notre matériel d'étude. Sur des algues, le mercure aura à traverser des barrières de perméabilité importantes avant d'atteindre la membrane du thylacoïde (membrane cellulaire, membrane chloroplastique) alors que sur notre matériel d'étude la membrane thylacoïdienne est directement accessible. Mais il est clair que ces résultats vont dans le même sens. Samson (1989) a aussi observé une atténuation de la fluorescence variable en présence de mercure et cette inhibition a aussi été renversée par l'hydroxylamine confirmant un effet du mercure sur le côté donneur du PS II. Nos résultats vont aussi dans le même sens que ceux de plusieurs équipes ayant suggéré que le côté donneur du PSII était affecté par le mercure (voir **tableau 4**, page 37).

Connaissant maintenant les conditions d'inhibition du mercure sur notre matériel d'étude, et sachant que le mercure exerce son action (totalement ou en partie) sur le côté donneur du PS II, il est maintenant possible de tenter de répondre à la première question soulevée dans l'introduction de la présente thèse. *Est-ce que le mercure interfère avec un ou des cofacteurs impliqués dans le processus de photooxydation de l'eau au PS II?* On se rappelle que trois cofacteurs, le chlorure, le calcium et le manganèse sont impliqués dans le processus de photooxydation de l'eau (voir section 1.2). Dans le but de vérifier si ces cofacteurs sont influencés par la présence de mercure, des expériences de renversement<sup>5</sup> en présence de différents sels ont été effectuées. La **figure 20** présente sous forme d'histogramme les résultats obtenus.

---

<sup>5</sup> Le terme renversement fait référence à des expériences où les sels sont ajoutés après une période d'incubation en présence de mercure. Le terme protection sera utilisé pour les expériences où le mercure et les sels sont ajoutés simultanément.



**Figure 20.** Effet de divers sels sur l'activité du PS II en présence ou en absence de mercure. La concentration des sels monovalents était de 20 mM et des sels divalents de 10 mM. Les FMRPSII étaient d'abord incubés pendant 5 minutes en absence ou en présence de 40  $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>. Ensuite, les sels étaient ajoutés en même temps que l'accepteur d'électrons (DCBQ). Au bout de 30 secondes supplémentaires, les échantillons étaient illuminés pour les mesures de dégagement d'oxygène.

On voit dans un premier temps que certains sels activent sensiblement l'activité des PS II en absence de mercure: on note que le TMAcI, le NaCl et le CaCl<sub>2</sub> ont stimulé l'activité du PS II d'environ 16%, 8% et 11% respectivement. Le chlorure étant un cofacteur essentiel au dégagement d'oxygène, il n'est pas étonnant que sa présence dans le milieu d'incubation

stimule quelque peu l'activité des FMRPSII, ce qui est couramment démontré dans la littérature (Homann, 1988b). Lorsqu'une concentration de 40  $\mu$ M HgCl<sub>2</sub> est ajoutée, on observe, en absence de sels ajoutés, une inhibition de 70% de l'activité du PS II. D'une façon surprenante, tous les sels de chlorure (NaCl, TMACl, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>) ont renversé significativement l'inhibition causée par le mercure (voir le tableau 10 ci-dessous).

**Tableau 10**  
**Effets de divers additifs sur l'activité du PS II**  
**en présence ou en absence de 40  $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>**

SELS	CONCENTRATION (mM)	DÉGAGEMENT D'OXYGÈNE (%)		INHIBITION <sup>1</sup> (%)	RENVER- SEMENT <sup>2</sup> (%)
		- Hg	+ Hg		
<b>Aucun</b>		<b>100</b>	<b>30</b>	<b>70</b>	<b>-</b>
TMACl	20 mM	108	62	<b>43</b>	<b>39</b>
NaCl	20 mM	116	65	<b>44</b>	<b>39</b>
CaCl <sub>2</sub>	10 mM	111	63	<b>43</b>	<b>39</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 mM	91	30	<b>67</b>	<b>4</b>
CaSO <sub>4</sub>	10 mM	98	27	<b>72</b>	<b>0</b>
MnSO <sub>4</sub>	10 mM	98	31	<b>68</b>	<b>1</b>
MnCl <sub>2</sub>	10 mM	98	69	<b>30</b>	<b>57</b>

<sup>1</sup> Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit:  

$$\frac{\text{Dég. d'O}_2 \text{ en absence de mercure} - \text{Dég. d'O}_2 \text{ en présence de mercure}}{\text{Dég. d'O}_2 \text{ en absence de mercure}} \times 100$$

<sup>2</sup> Le pourcentage de renversement est calculé comme suit:  

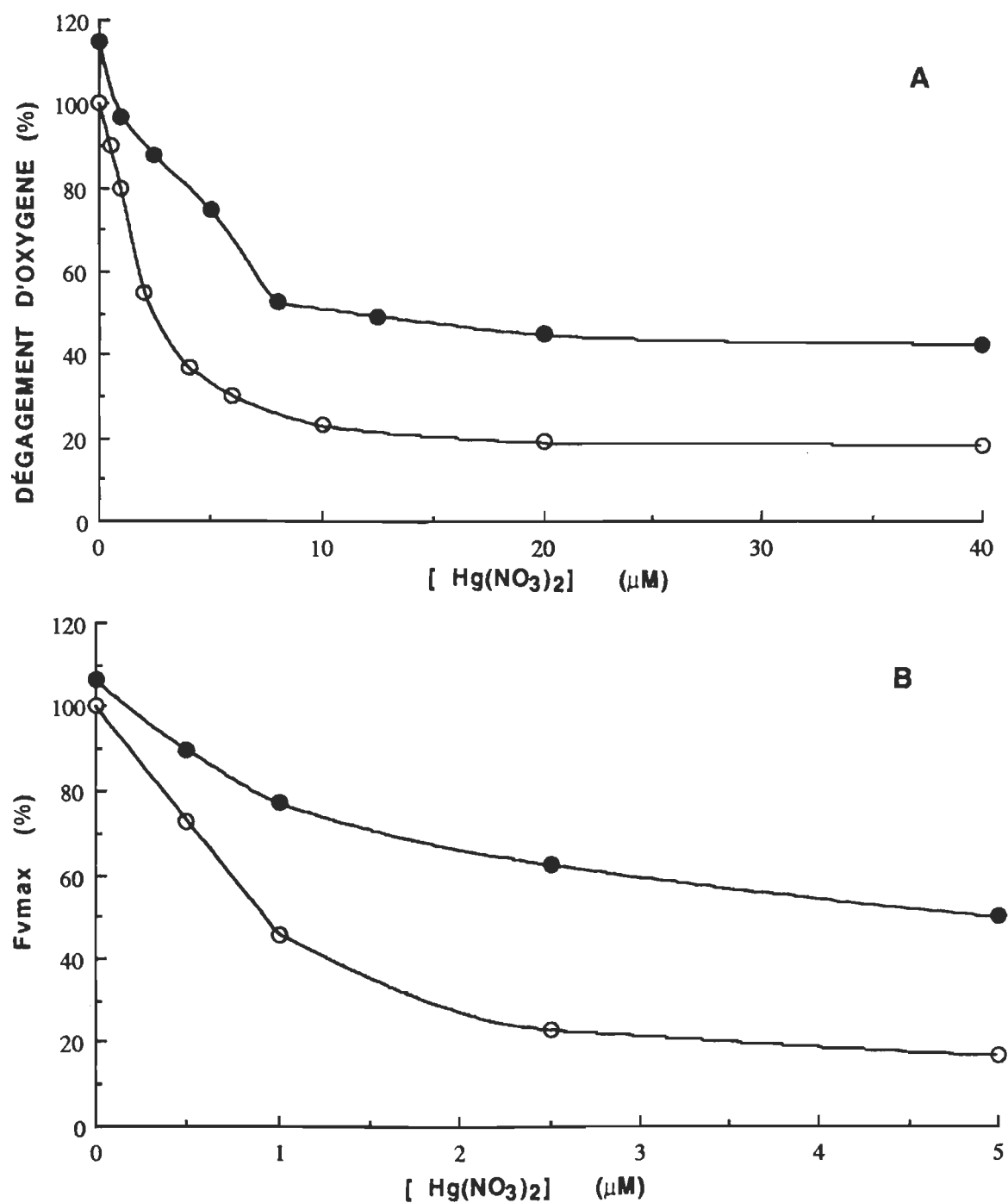
$$\frac{\% \text{ d'inhibition en absence du sel} - \% \text{ d'inhibition en présence du sel}}{\% \text{ d'inhibition en absence du sel}} \times 100$$

Le Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a renversé quelque peu l'inhibition causée par le mercure (4 %), alors que le CaSO<sub>4</sub> et le MnSO<sub>4</sub> n'ont montré aucun effet. L'ion nitrate peut remplacer l'ion chlorure



lors de l'activation du PS II, mais moins efficacement (Homann, 1988b). Ceci explique un faible renversement de l'inhibition en présence de  $(\text{CaNO}_3)_2$ . D'autre part, ni le calcium, ni le manganèse associés à d'autres anions que le chlorure ( $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ), n'ont pu lever l'inhibition causée par le mercure, ce qui suggère que l'équilibre de ces deux cations divalents ne semble pas être perturbé par l'action du mercure, perturbation à laquelle on aurait pu s'attendre compte-tenu de la similarité de charges portées par ces atomes. D'une façon assez surprenante, il semble que seul les anions chlorures soient influencés par la présence de mercure. Nous avons donc exploré plus en détails l'effet du mercure sur l'équilibre des ions chlorures. Pour ces études sur le chlorure nous avons utilisé le TMACl. Selon Waggoner, Pecoraro et Yocum (1989), l'ion sodium peut avoir un effet inhibiteur sur le PS II à des concentrations supérieures à 10 mM, alors que l'ion  $\text{TMA}^+$  ne modifie pas l'activité du PS II. Ainsi, pour éviter toute interférence causée par l'ion sodium, le TMACl a été utilisé pour toutes les expériences de réactivation au lieu du NaCl. De plus, le pH des milieux d'incubation a été ajusté à l'aide du TMAOH au lieu du NaOH pour les mêmes raisons. Finalement, pour éviter toute interférence du chlorure contenu dans le  $\text{HgCl}_2$ , même si nous sommes dans l'ordre du  $\mu\text{M}$ , les échantillons ont été traités avec le  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ .

La figure 21A montre l'effet de 10 mM TMACl sur l'inhibition causée par le mercure pour des concentrations de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  allant jusqu'à 40  $\mu\text{M}$ . À toutes les concentrations utilisées, la présence de 10 mM TMACl, a renversé partiellement l'effet inhibiteur du mercure sur le dégagement d'oxygène. Des expériences de protection ont aussi été effectuées, c'est-à-dire où le mercure et le TMACl étaient ajoutés simultanément plutôt que subséquentement. Dans ce cas, on pouvait observer le même profil qu'à la figure 21A, sauf que la protection était plus importante que le renversement. Par exemple, pour une concentration de mercure de 20  $\mu\text{M}$ , on observe un renversement de l'inhibition de l'ordre de 30%, alors qu'on observe une protection de l'ordre de 75%.



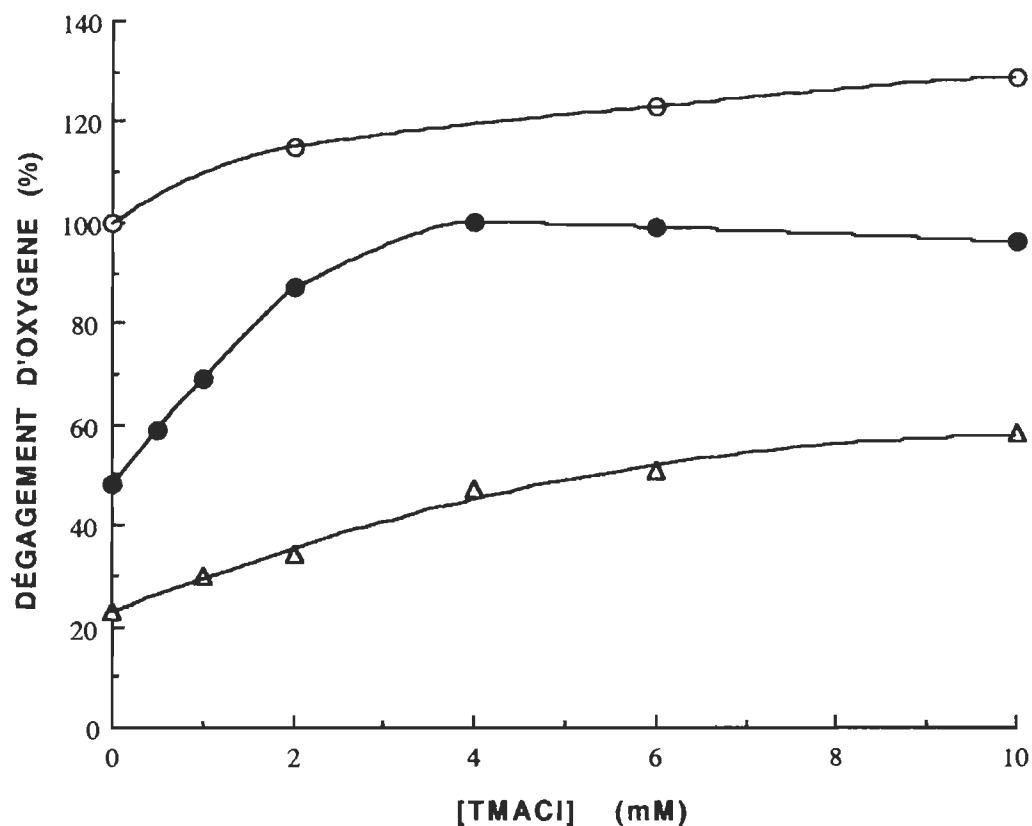
**Figure 21.** Effet du mercure sur l'activité du PS II en absence (○) ou en présence (●) de 10 mM TMACl. A.- Effet du mercure sur l'activité de dégagement d'oxygène B. Effet du mercure sur l'émission de fluorescence ( $F_{v\text{max}} = F_{\text{max}} - F_0$ ) ( $F_0$  est demeuré constant).

Cet effet du chlorure a aussi été observé au cours des expériences de fluorescence. L'atténuation de fluorescence obtenue en présence de concentrations croissantes de mercure (voir **figure 19A**) a été significativement renversée en présence de 10 mM TMACl (voir **figure 21B**). Il est à noter que l'inhibition obtenue lors des mesures de fluorescence survient à de plus faibles concentrations de mercure. Les mesures de dégagement d'oxygène ont été effectuées avec des concentrations en Chl de 15 µg/ml alors que les mesures de fluorescence avec des concentrations de 5 µg/ml. Ceci permet d'expliquer les différences quantitatives d'inhibition observées.

Le renversement de l'inhibition causé par le chlorure a aussi été étudié en fonction de la concentration de TMACl (**Figure 22**). Des concentrations croissantes de TMACl ont légèrement stimulé l'activité des PS II intacts et graduellement renversé l'inhibition causée par le mercure.

Des analyses de type enzymatique ont été effectuées sur ce tracé et apportent des informations sur le mode d'action du mercure. Le tracé de la double réciproque (**figure 23A**) indique qu'il s'agit d'une inhibition de type mixte. Le tracé secondaire de la double réciproque représentant l'interception de  $1/v$  vs concentration de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  est aussi linéaire (voir **figure 23B**), ce qui indique une inhibition de type mixte linéaire. Selon Segel (1975), ce système est considéré comme un mélange d'inhibition compétitive partielle et d'inhibition non-compétitive pure. La composante d'inhibition compétitive partielle indique que le mercure et le chlorure se lient à des sites différents sur le PS II et que le chlorure a une affinité plus faible pour le PS II lorsque le mercure est lié au complexe ( $K_m$  plus élevé). De plus, la composante d'inhibition purement non-compétitive suggère que la liaison du mercure rend le complexe inactif en ce qui concerne la production d'oxygène ( $V_m$  diminué). Ces résultats suggèrent que le mercure n'interagit pas directement avec le site de liaison des

chlorures mais pourrait exercer son action en induisant un changement conformationnel qui perturbe la fonction catalytique et/ou structurelle des ions chlorures et qui rend le PS II inopérant.



**Figure 22:** Dégagement d'oxygène en fonction de la concentration de TMACl en présence de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  (○) 0  $\mu\text{M}$ ; (●) 2.5  $\mu\text{M}$ ; (Δ) 8  $\mu\text{M}$ .

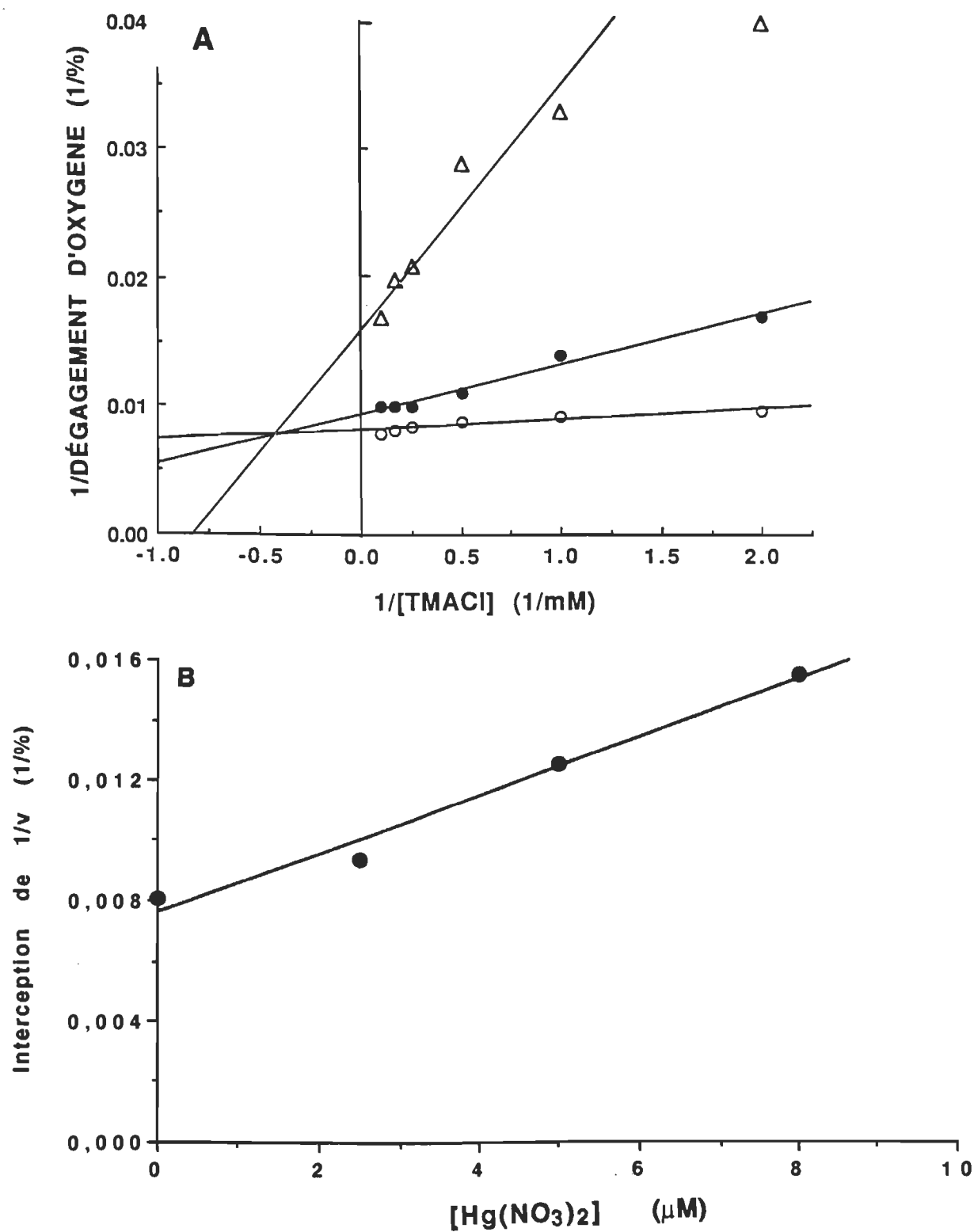
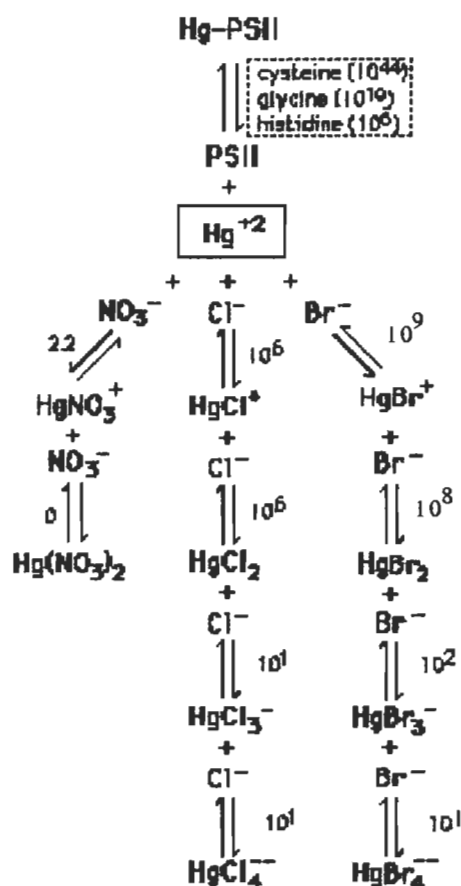


Figure 23. A. Double réciproque du tracé de la figure 22. B. Tracé secondaire de la double réciproque.

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant démontrent clairement que le mercure exerce son action sur le côté donneur du PS II à un site relié aux chlorures. Cependant, avant de proposer définitivement un mécanisme d'action il est important de déterminer si ce renversement par les chlorures est attribuable à une action des chlorures sur le PS II ou simplement dû à une complexation chimique entre le mercure et le chlorure, une telle complexation empêchant le mercure de se lier au PS II. Les analyses cinétiques ne peuvent s'expliquer par une simple complexation chimique. Si c'était le cas, le tracé de la double réciproque aurait montré exclusivement un profil d'inhibition non compétitive pure (seulement  $V_{max}$  de modifié). Le fait qu'il s'agit d'une inhibition de type mixte, écarte la possibilité qu'il s'agisse exclusivement de complexation chimique.

Un autre type d'expérience nous a permis d'évaluer l'importance de la complexation chimique dans le renversement de l'inhibition causée par le mercure. Des expériences de renversement ont été effectuées en utilisant trois anions: le chlorure, le bromure et le nitrate. Selon leurs constantes de stabilité (voir les équations 1, 2 et 3 à la page 81) ces anions se lient au mercure selon l'ordre d'affinité suivant:  $Br^- > Cl^- \gg NO_3^-$  (Ringbom, 1967). Cependant, ces trois anions stimulent l'activité des PS II selon un séquence différente. En effet, sur des PS II intacts ou suite à des traitements perturbateurs connus (chaleur, Tris, enlèvement de polypeptides extrinsèques), il est possible d'activer le PS II à l'aide de ces trois anions dans l'ordre suivant:  $Cl^- > Br^- > NO_3^-$  (Homann, 1988b). La figure 24, illustre en détails cette problématique et le tableau 11, montre les résultats obtenus pour les études de renversement. Ces trois anions ont renversé l'effet inhibiteur du mercure dans l'ordre suivant:  $Cl^- > Br^- > NO_3^-$ , ce qui correspond à l'ordre attendu pour une activation des PS II et non pour une complexation chimique du mercure avec ces anions. La possibilité qu'il y ait complexation chimique ne peut pas être totalement exclue, et peut probablement

## FORMATION DE COMPLEXES ENTRE LE MERCURE ET LES ANIONS



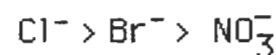
## EFFICACITÉ DES ANIONS SUR LE PSII

### Activation du dégagement d'oxygène

sur des PSII intacts

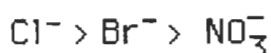


suite à l'enlèvement de PE16 et PE2



### Protection du PSII

suite à un traitement au Tris



suite à un traitement à la chaleur

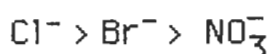


Figure 24. Représentation schématique illustrant l'affinité de certains anions avec le mercure (d'après Ringbom, 1967) ainsi que l'efficacité de ces mêmes anions sur le PS II (d'après Homann, 1988b). Les valeurs indiquées correspondent aux constantes de formation de complexe (voir p. 42 pour l'équation générale).

Tableau 11

Effets de trois sels de sodium sur l'activité de dégagement d'oxygène en présence ou en absence de 20  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$

SELS (10 mM)	DÉGAGEMENT D'OXYGÈNE (%)		INHIBITION (%)	RENVERSEMENT (%)
	-Hg	+ Hg		
Aucun	100	25	75	0
NaCl	126	89	32	57
NaBr	117	63	45	40
NaNO <sub>3</sub>	87	33	62	17

Les pourcentages de renversement et d'inhibition sont calculés comme au tableau 10.

contribuer à la composante d'inhibition non-compétitive pure observée lors des analyses cinétiques, mais il est clair ici, que si la complexation survient, il s'agit d'une composante mineure dans le phénomène observé. Enfin, à la lueur de ces résultats, il est possible de conclure que l'effet du mercure sur le PS II est réellement associé à une perturbation de l'équilibre des ions chlorures, mais il est important de se rappeler que la liaison du mercure ne se fait pas directement au(x) site(s) de liaison des chlorures, comme l'indique la composante d'inhibition compétitive partielle. On peut penser à un changement conformationnel qui perturberait les fonctions catalytiques et/ou structurelles des ions chlorures au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. Je mentionne les fonctions catalytiques ou structurelles des ions chlorures, car comme mentionné dans la section 1.2, on connaît encore mal le rôle précis des ions chlorures dans le fonctionnement du PS II, on leur attribue pour le moment des fonctions catalytiques et structurelles.

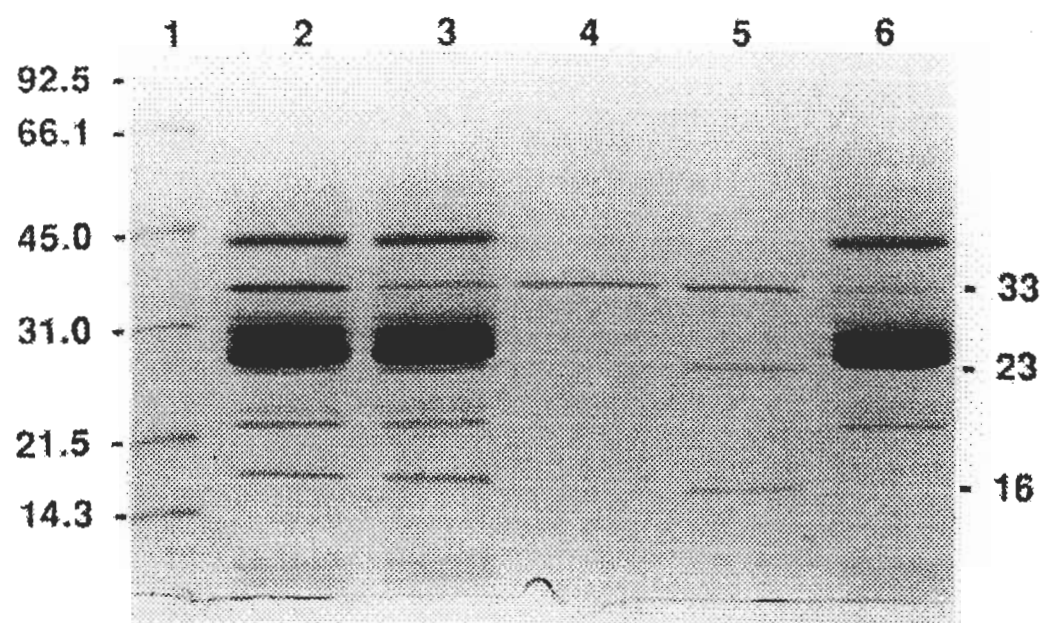


Avec cette première série d'expériences, il est maintenant possible de répondre à la première question soulevée dans l'introduction: *"Est-ce que le mercure interfère avec un ou des cofacteurs impliqués dans le processus de photooxydation de l'eau au PS II?"* Il semble que seul le chlorure soit affecté par la présence de mercure. Il s'agit ici d'une première démonstration que sur le côté donneur du PS II, le mercure exerce son action à un site relié aux chlorures. Les études antérieures ont montré que le complexe de dégagement d'oxygène était probablement affecté par le mercure (De Fillipis, 1981; Samson et Popovic, 1990; Samson, Morissette et Popovic, 1990; Murthy, Bukhov et Mohanty, 1990; Murthy, Sabat et Mohanty, 1990; Hsu et Lee, 1988; Honeycutt et Krogman, 1972; Kinimura et Katoh, 1972), mais aucune de ces études n'avait encore déterminé quelle(s) composante(s) pouvait(ent) être affectée(s). Le fait qu'un seul cofacteur ne soit affecté présente aussi un grand intérêt. En effet, la plupart des traitements perturbant la structure ou la fonction du PS II modifieront les besoins en ions chlorures et en ions calcium pour le dégagement d'oxygène (Miyao et Murata, 1985). Nous sommes probablement en présence d'un effet inhabituel du mercure. Enfin, il est connu que l'enlèvement des polypeptides extrinsèques de 16, 23 et 33 kDa conduit à une inhibition de l'activité de dégagement d'oxygène et que l'activité peut être restaurée, au moins partiellement, par l'addition de chlorure et de calcium. Considérant toutes ces observations, il est d'un grand intérêt de vérifier l'impact du mercure sur les protéines du PS II, ce qui fera l'objet de la prochaine section.

### 3.3- Effets du mercure sur l'intégrité structurale du PS II

Comme mentionné dans les lignes précédentes, il est fort pertinent de tenter de répondre à la deuxième question posée dans l'introduction; "*Est-ce que le mercure modifie la composition polypeptidique du PS II?*". La **figure 25** montre le profil polypeptidique de FMRPSII suite à divers traitements. Dans la colonne 3, on remarque qu'une incubation des FMRPSII pendant 30 minutes avec 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  cause le relargage d'environ 40% d'un polypeptide de 33 kDa. Ce polypeptide de 33 kDa a été récupéré dans le surnageant de l'échantillon traité comme on peut voir à la colonne 4. Aucun autre polypeptide n'a été observé dans le surnageant. Dans la colonne 6, on retrouve le profil de FMRPSII traités à l'urée. Ce traitement est utilisé pour l'enlèvement de trois polypeptides extrinsèques de 16, 23 et 33 kDa (PE16, PE23 et PE33) (Miyao et Murata, 1984b). La protéine de 33 kDa relarguée suite à un traitement au mercure (colonne 4) correspond au polypeptide PE33 relargué lors du traitement à l'urée (colonne 5). Il est important de remarquer que les polypeptides PE16 et PE23 libérés suite à un traitement à l'urée, n'ont pas été touchés suite au traitement au mercure.

Une étude plus détaillée a été effectuée en fonction de la concentration de mercure. Le contenu en PE16, PE23 et PE33 suite à un traitement de 30 minutes à différentes concentrations de mercure est montré à la **figure 26**. La **figure 26A** montre le résultat pour des FMRPSII isolés à partir de plants d'orge et la **figure 26B** pour des FMRPSII isolés à partir de plants d'épinard. À toutes les concentrations utilisées, le contenu en PE16 et PE23 est demeuré sensiblement le même. Cependant, PE33 est graduellement libéré jusqu'à des concentrations de 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ . Au-delà de cette concentration, l'effet semble inversé, et on trouve de moins en moins de PE33 libéré.



**Figure 25.** Gel d'électrophorèse de diverses préparations de FMRPSII illustrant l'enlèvement de la 33 kDa par le mercure. Colonne 1, Standards de poids moléculaire: phosphorylase B, sérum d'albumine bovine, ovalbumine, anhydrase carbonique, inhibiteur de trypsine de soya et lysosyme. Colonne 2, FMRPSII contrôles; Colonne 3, FMRPSII traités avec 10  $\mu$ M  $\text{HgCl}_2$ ; Colonne 4, Surnageant des FMRPSII traités au mercure; Colonne 5, Surnageant des FMRPSII traités à l'urée; Colonne 6, FMRPSII traités à l'urée. Les chiffres apparaissant à gauche et à droite indiquent les poids moléculaires en kDa. Les traitements sont décrits en détails dans la section Matériel et méthodes.

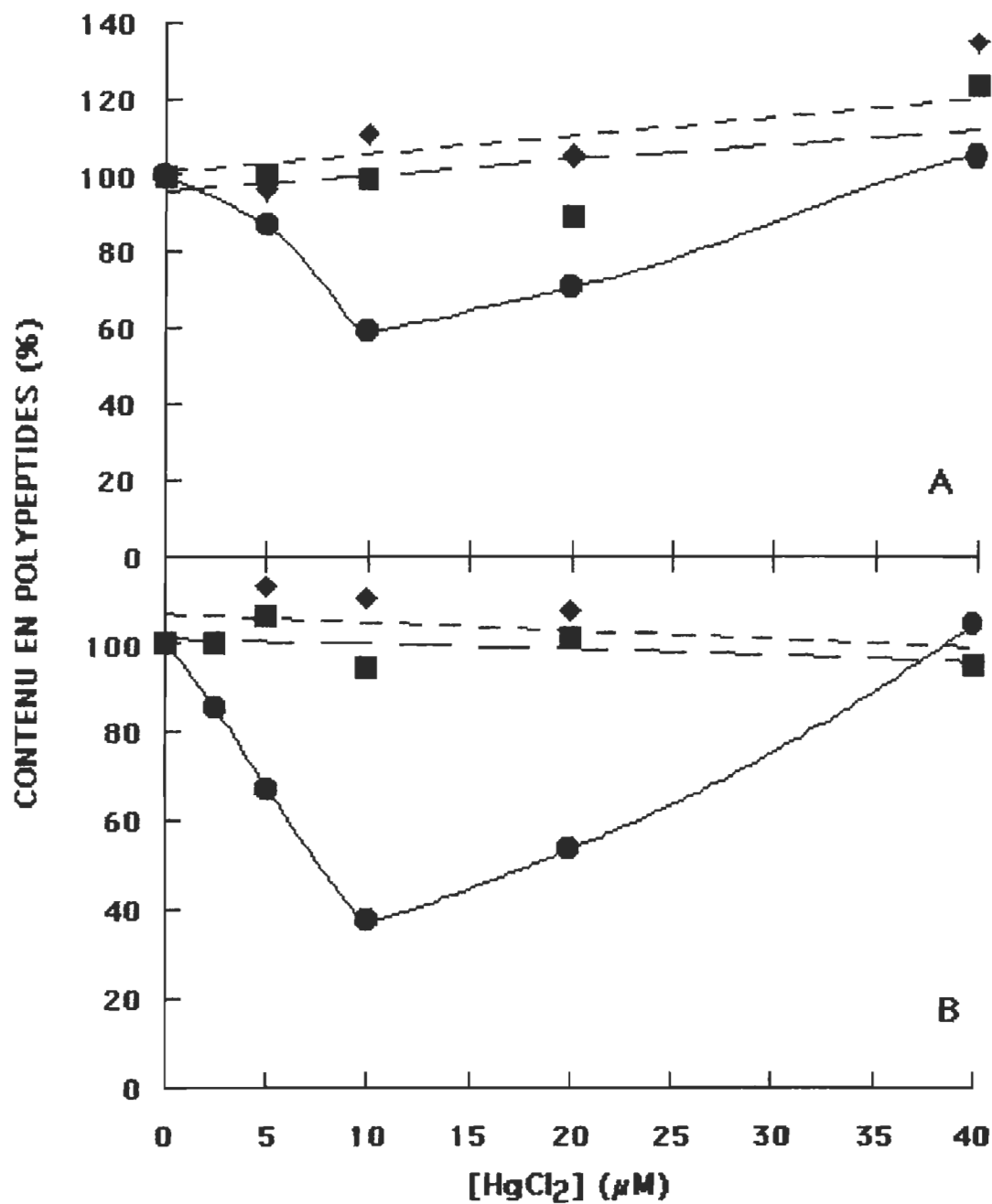


Figure 26. Contenu en polypeptides des FMRPSII préparés à partir d'orge (A) et d'épinards (B) en fonction de la concentration de mercure: (●) 33 kDa ; (■) 23 kDa et (◆) 16 kDa.

Il est difficile d'expliquer cet étrange phénomène. Ça ne semble pas être relié à un problème de solubilité étant donné que les mesures sont effectuées dans l'ordre du  $\mu\text{M}$  et que le point de solubilité du  $\text{HgCl}_2$  est beaucoup plus élevé (6.9 g/ 100 ml, c'est-à-dire 345 mM) (Weast, 1985). Donc, à de plus fortes concentrations, il semble y avoir deux effets contradictoires, un causant l'enlèvement du polypeptide de PE33 et un autre tendant à maintenir le polypeptide lié à la membrane, ce qui pourrait expliquer qu'on n'ait pu obtenir un relargage complet du polypeptide. L'enlèvement maximal observé a été de 50% pour les préparations obtenues à partir d'orge et de 60% pour celles obtenues à partir d'épinard. PE33 semble plus étroitement lié à la membrane chez l'orge que chez l'épinard. En effet, le même phénomène a été observé lors des traitements à l'urée, on ne pouvait déloger que 60% de 33 kDa chez l'orge alors qu'un relargage presque complet (95 %) était obtenu pour l'épinard.

Ce relargage du polypeptide PE33 en présence de mercure a été analysé sur une préparation de FMRPSII déjà dépourvue des polypeptides extrinsèques PE16 et PE23. On pense que ces polypeptides sont étroitement associés à PE33 (voir 1.3.2.1 de l'introduction). Il est possible cependant de les déloger tout en laissant PE33 lié à la membrane. Le traitement utilisé est décrit dans la section 2.3.2 de la section matériel et méthodes. On note à la figure 27, que malgré l'absence de ces deux polypeptides extrinsèques, l'enlèvement de PE33 n'a pas été modifié: l'enlèvement maximal ainsi que les concentrations requises sont demeurées sensiblement les mêmes. L'accessibilité du mercure à son site d'action ainsi que la sensibilité de PE33 à cet agent perturbateur ne sont pas liés à la présence de PE16 et PE23. Pourtant, plusieurs auteurs suggèrent une étroite association entre ces trois polypeptides extrinsèques. Nous y reviendrons plus loin (voir la discussion).

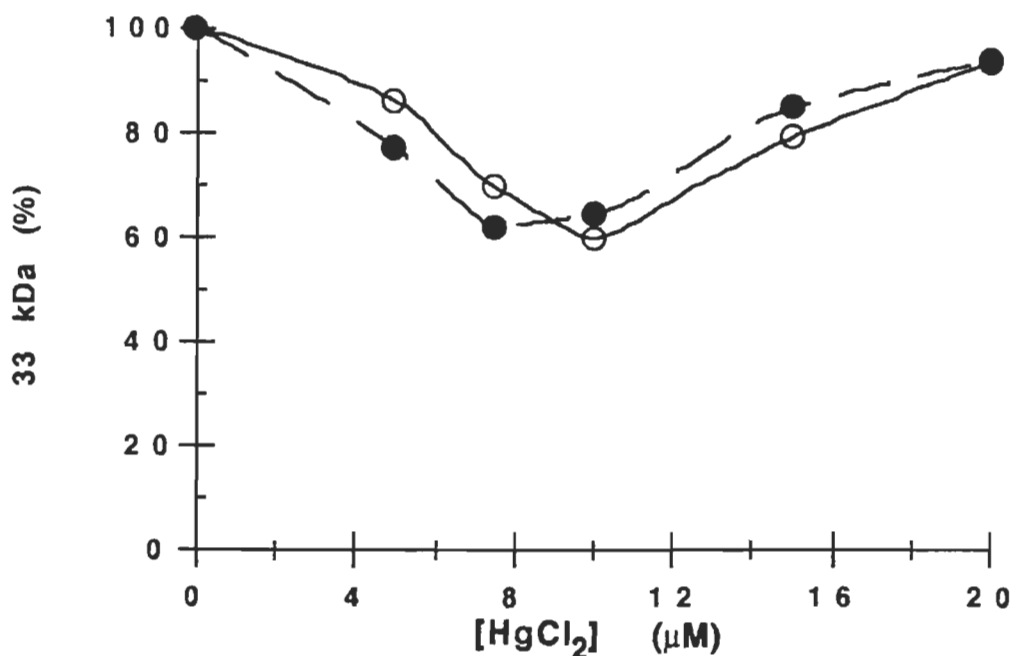


Figure 27. Contenu en polypeptide de 33 kDa des préparations de FMRPSII natives (○) ou dépourvues des polypeptides de 16 et 23 kDa (●) en fonction de la concentration de mercure.

L'effet du mercure sur l'activité de dégagement d'oxygène a été comparé à son effet sur le relarguage du polypeptide extrinsèque de 33 kDa. La figure 28 montre le résultat en fonction de la concentration de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ . La perte d'activité semble survenir à de plus faibles concentrations que la perte du polypeptide. De plus, à de plus fortes concentrations, PE33 cesse d'être libéré alors que l'activité continue à décliner. Les mêmes résultats ont été observés en utilisant le  $\text{HgCl}_2$  (résultats non montrés). Comment expliquer ce phénomène? Nous croyons être en présence de deux effets combinés. D'abord un effet primaire du

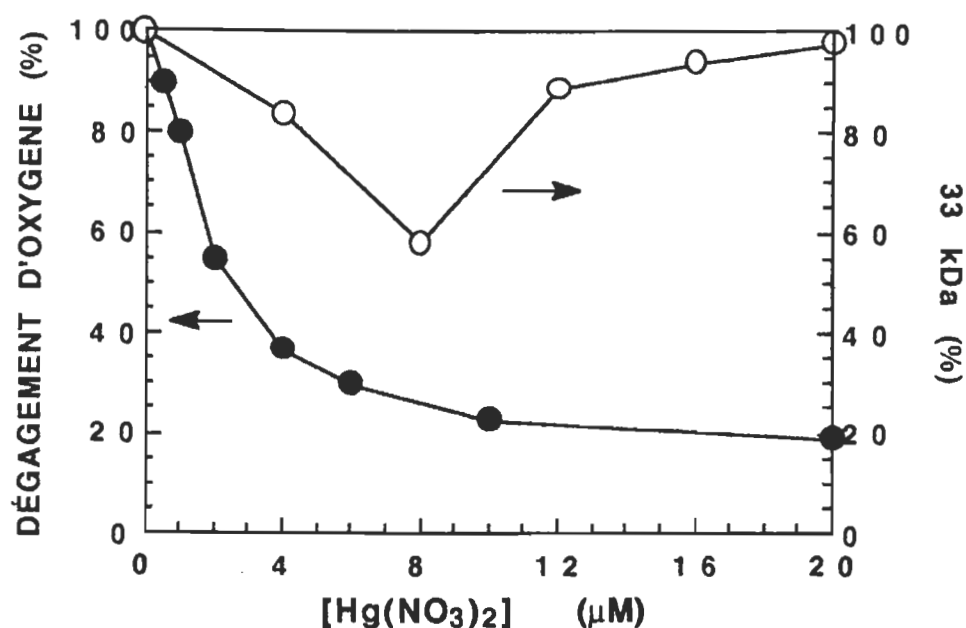
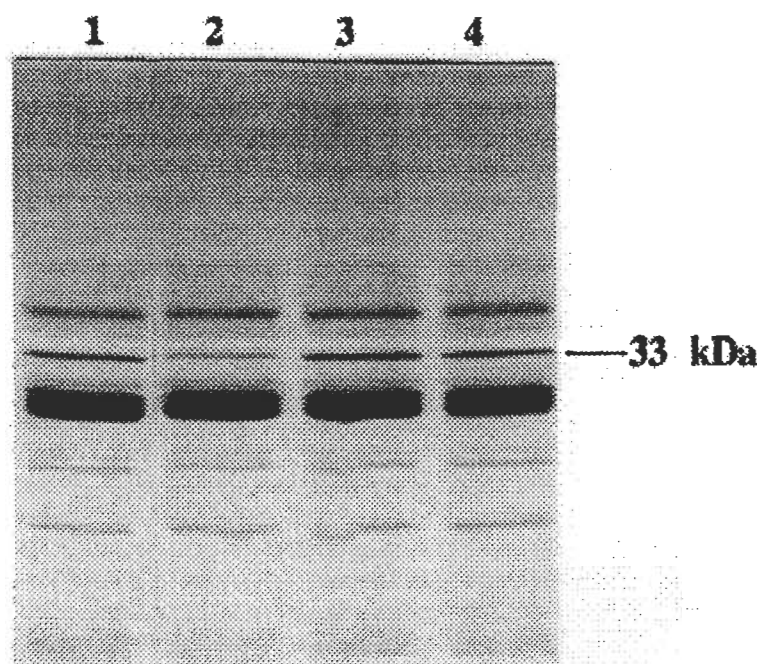


Figure 28. Dégagement d'oxygène (●) et contenu en 33 kDa (○) des FMRPSII en fonction de la concentration de mercure.

mercure qui rend le complexe de dégagement d'oxygène non fonctionnel et qui provoque la perte de PE33; ensuite un effet secondaire qui prévient le relargage de PE33 à des concentrations plus élevées que 10 μM et qui retarde sa libération à de plus faibles concentrations. Cet effet secondaire expliquerait l'écart observé entre la perte d'activité et la perte du polypeptide à une concentration donnée. Mais nous croyons que dans un premier temps, la perte de polypeptide et la perte d'activité sont reliés. L'expérience suivante permet de supporter cette affirmation. En effet, nous avons précédemment démontré que la présence de chlorure, un cofacteur essentiel au dégagement d'oxygène, atténue l'inhibition de l'activité de dégagement d'oxygène causée par le mercure. Nous avons ici vérifié l'effet des chlorures sur l'enlèvement des polypeptides. La figure 29 montre un gel d'électrophorèse où dans un premier temps, les FMRPSII ont été traités avec 10 μM de HgCl<sub>2</sub> en absence de

TMACl (colonne 2). On peut voir la diminution de la bande de poids moléculaire de 33 kDa comparé au contrôle (colonne 1): on observe une perte de PE33 d'environ 40%. Ensuite, le même traitement au mercure a été effectué mais en présence de 5 mM TMACl. La perte de PE33 est largement réduite en présence de TMACl, on observe une perte d'environ 5%. Ainsi, le chlorure protège le PS II de l'effet inhibiteur du mercure tant en limitant son effet sur l'activité de dégagement d'oxygène que sur la perte du polypeptide de 33 kDa. Nous y voyons là un indice que les deux phénomènes sont reliés.



**Figure 29.** Gel d'électrophorèse des FMRPSII montrant l'effet des chlorures sur l'enlèvement de PE33 par le mercure. Colonne 1, FMRPSII contrôles; Colonne 2, FMRPSII traités avec 20  $\mu$ M HgCl<sub>2</sub> ; Colonne 3, FMRPSII contrôles incubés avec 5 mM TMACl ; Colonne 4, FMRPSII incubés avec 20  $\mu$ M HgCl<sub>2</sub> et 5 mM TMACl.

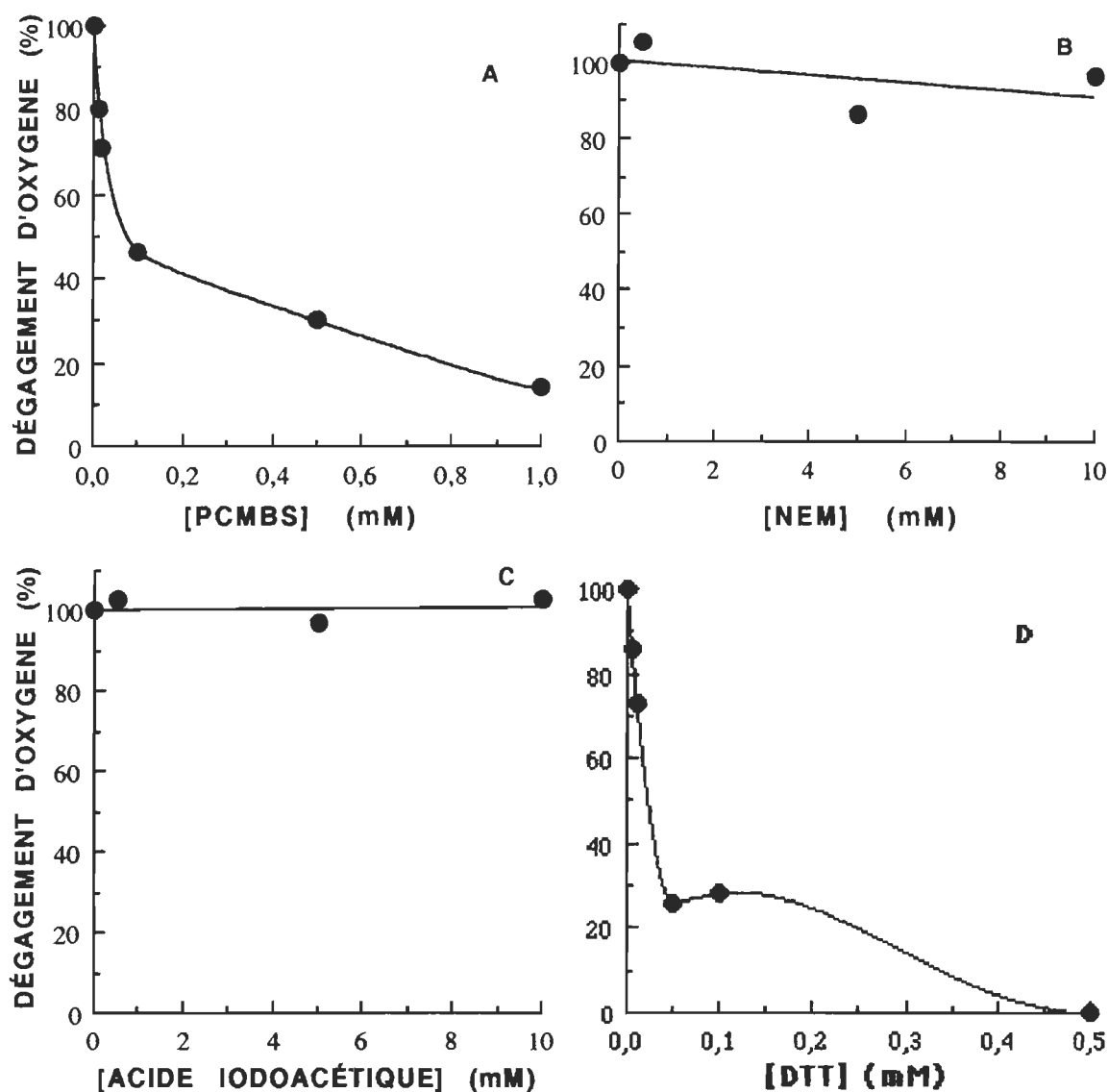


L'ensemble des données présentées dans cette section montre clairement que PE33 peut être délogé de la membrane du PS II par de faibles concentrations de mercure, et ce sans provoquer l'enlèvement des deux polypeptides extrinsèques de PE16 et PE23 (figure 2 5). De plus, la présence ou l'absence de ces polypeptides n'affecte pas l'action du mercure sur l'enlèvement de PE33 (figure 2 7). Ces résultats sont fort surprenants, car il s'agit du premier traitement connu où PE33 est délogé de la membrane sans l'enlèvement concomitant de PE16 et de PE23. En effet, l'ensemble des traitements destinés à déloger PE33 ont toujours provoqué l'enlèvement simultané de PE16 et PE23. (voir tableau 13 et Andreasson et Åkerlund, 1987; Ghanotakis, 1985). Nous croyons être en présence d'un effet hautement spécifique du mercure sur le PS II. On connaît l'affinité exceptionnelle du mercure pour les groupements sulfhydryls des protéines ( $K=10^{41}$ ) (Falchuk, Goldwater et Vallee, 1977). Plusieurs protéines intrinsèques et extrinsèques du PS II portent des cystéines (Gray et coll., 1989). Dans la prochaine section nous comparerons l'effet du mercure avec d'autres modificateurs de cystéines dans le but de mieux caractériser cet effet du mercure.

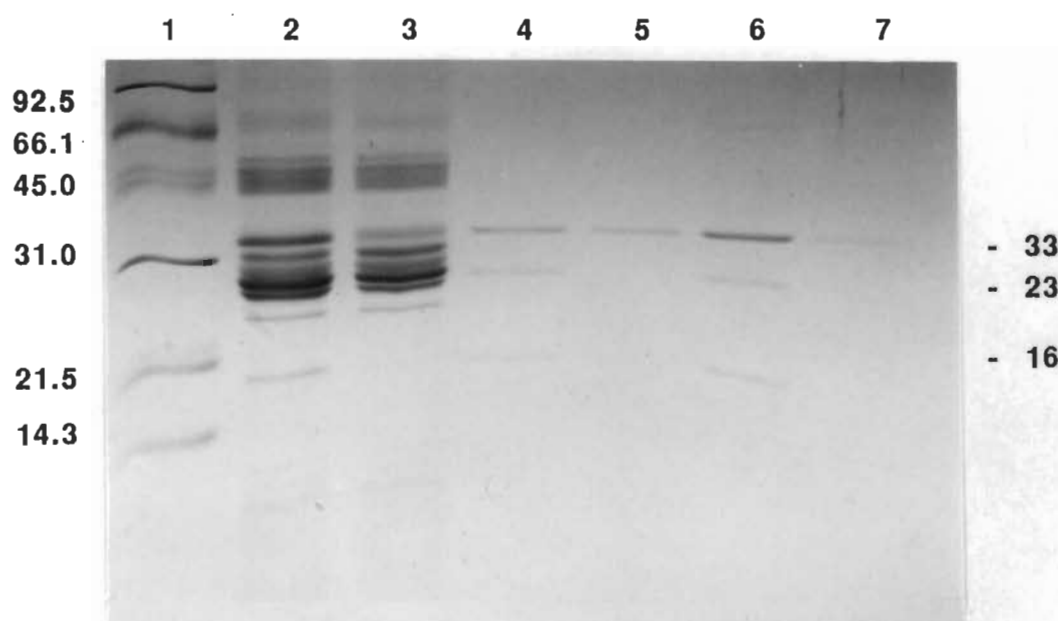
### 3.4- Effets d'autres modificateurs de cystéines sur l'intégrité structurale et fonctionnelle du PS II

Un ensemble d'agents modificateurs de cystéines ou de cystines a été sélectionné dans le but de faire une analyse comparative avec les résultats obtenus précédemment avec le mercure inorganique ( $\text{HgCl}_2$  ou  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ). Le NEM (n-éthylmaléimide), le PCMBS (acide p-chloromercuriphénylsulfonique) ainsi que l'acide iodoacétique ( $\text{ICH}_2\text{COOH}$ ) ont été utilisés comme agents modificateurs des groupements -SH libres des protéines alors que le DTT (dithiothréitol) comme agent réducteur capable de briser les ponts disulfures (Lundlab et Noyes, 1984). La figure 30 montre l'effet de ces agents sur l'activité de dégagement d'oxygène. La figure 31 montre l'effet de ces agents sur le contenu en polypeptides. Le tableau 12 présente une synthèse de l'ensemble de ces résultats.

Sur le plan fonctionnel, on peut noter que le mercure inorganique est le plus puissant inhibiteur suivi du DTT et du PCMBS. Le NEM et l'acide iodoacétique (AI) n'ont pas affecté le dégagement d'oxygène dans l'écart de concentration utilisé. La figure 31 montre le profil électrophorétique pour les agents ayant modifié l'activité de dégagement d'oxygène: dans la colonne 2, on retrouve les FMRPSII témoins, dans la colonne 3 des FMRPSII traités à l'urée, un traitement connu pour l'enlèvement des trois polypeptides extrinsèques, on peut retrouver ces trois polypeptides dans le surnageant à la colonne 4. Dans les colonnes 5, 6 et 7, on retrouve un profil des surnageants suite à des traitements au  $\text{HgCl}_2$ , au PCMBS et au DTT respectivement. On peut observer que PE33 a été délogé en présence de  $\text{HgCl}_2$ ; PE33, PE23 et PE16 en présence de PCMBS et que le DTT n'a pas provoqué l'enlèvement de polypeptides sauf une quantité négligeable de PE33. Pour ce qui est du NEM et de l'acide iodoacétique, le profil électrophorétique indique qu'ils n'ont pas affecté le contenu en polypeptides du PSII (résultats non montrés), ce qui n'est pas surprenant étant donné qu'ils n'ont pas affecté l'activité de ce dernier.



**Figure 30.** Effet de divers agents modificateurs sur le dégagement d'oxygène. Les FMRPSII ont été incubés pendant cinq minutes en présence des agents suivants:  
 A- PCMBBS; B- NEM; C- Acide iodoacétique; D- DTT. L'effet du mercure a déjà été présenté à la figure 18.



**Figure 31.** Gel d'électrophorèse des FMRPSII suite à divers traitements avec des modificateurs de cystéines et de cystines. Colonne 1, Standards de poids moléculaire; Colonne 2, FMRPSII contrôles; Colonne 3: FMRPSII traités à l'urée; Colonne 4, 5, 6 et 7, Surnageants des FMRPSII traités à l'urée; au  $\text{HgCl}_2$  (0,01 mM); au PCMBs (1 mM) et au DTT (0,5 mM) respectivement.

Tableau 12<sup>6</sup>

**Effet de divers modificateurs chimiques sur  
l'intégrité fonctionnelle et structurale du PS II**

CONCENTRATION (mM)	DÉGAGEMENT D'OXYGENE (%)				
	HgCl <sub>2</sub>	PCMBS	NEM	A.I.	DTT
0.00	100	100	100	100	100
0.01	46	80	-	-	73
0.10	20	46	99	101	28
1.00	0	14	-	-	0
10.00	0	0	95	103	0
<b>Polypeptides délogés</b>	PE33	PE16 PE23 PE33	aucun	aucun	aucun

Les FMRPSII ont été incubés en présence des différents agents pendant 30 minutes. Le reste de la procédure est décrit dans la section matériel et méthode.

On se retrouve donc avec un amalgame de résultats. On peut d'abord noter que parmi les modificateurs de groupements -SH libres utilisés, seuls les agents contenant du mercure (HgCl<sub>2</sub> et PCMBS) ont affecté le dégagement d'oxygène et l'intégrité des polypeptides extrinsèques. Il peut s'agir ici d'une question d'accessibilité des diverses molécules à leur site d'action. Il peut s'agir aussi d'une différence de réactivité des groupements sulfhydryls envers les modificateurs. En effet, il est possible que la cystéine "déterminante" ne soit sensible qu'à un seul type de modification. Cependant, nous ne pouvons exclure aussi la possibilité que le mercure agisse sur un autre résidu d'acide aminé, ce qui expliquerait l'écart entre les résultats obtenus pour le même groupe de modificateurs. On sait que le mercure

<sup>6</sup> Le tableau 12 présente l'impact des modificateurs sur les polypeptides extrinsèques du PSII, mais il est à noter que des analyses densitométriques de chaque gels ont été effectuées et que dans tous les cas aucun des autres polypeptides du PSII n'a été affecté significativement.

présente une affinité exceptionnelle pour les cystéines ( $K = 10^{41.6}$ ), mais il présente aussi une affinité considérable ( $K = 10^{21}$ ) pour les résidus histidine (Falchuk, Goldwater et Vallee, 1977; Jacobson et Turner, 1980). Nous ne pouvons à ce stade-ci de l'étude retenir une ou l'autre de ces possibilités, nous y consacrerons une section de la discussion.

De plus, on peut voir que le  $\text{HgCl}_2$ , le plus puissant inhibiteur a uniquement causé l'enlèvement de PE33 alors que le PCMBs a délogé PE33, PE23 et PE16. Cette différence est difficile à expliquer. On pourrait s'attendre à ce que ces deux agents affectent de façon similaire le PS II. Cependant, il peut s'agir ici aussi de différences au point de vue de l'accessibilité du modificateur et/ou de sa réactivité si on tient compte que nous sommes en présence d'une forme inorganique et d'une forme organique de mercure. Il est tentant de mentionner une fois de plus que le mercure (sous sa forme inorganique) semble exercer une action bien spécifique sur le PS II en ne délogeant que PE33.

Enfin, pour ce qui est du résultat obtenu avec le DTT, on remarque un résultat intermédiaire, où l'activité de dégagement d'oxygène est perturbée alors que les polypeptides extrinsèques ne sont pas délogés de la membrane. Ce résultat va dans le même sens que l'étude effectuée par Irrgang et coll. (1992) avec le DTE un analogue du DTT qui réduit aussi les ponts disulfures. Dans leur cas, une inhibition du dégagement d'oxygène de 50% est obtenue avec une concentration de 300  $\mu\text{M}$  DTE et aucun polypeptide n'est délogé de la membrane. Dans notre cas, avec le DTT, une concentration de 50  $\mu\text{M}$  occasionne une perte d'activité de 50% sans aucune perte significative de polypeptide. Un pont disulfure semble donc être essentiel au maintien de l'intégrité fonctionnelle du PS II.

Ainsi, le  $\text{HgCl}_2$  et le PCMBs qui modifient les groupements -SH libres exercent leur action sur le PS II différemment du DTT qui lui brise les ponts S-S. Certains auteurs

(Tanaka et Wada, 1988; Camm et coll., 1987) ont suggéré que les deux cystéines présentes sur PE33 soient sous la forme oxydée, c'est-à-dire qu'elles forment un pont disulfure essentiel à la fonction de PE33 (voir la figure 32 où la séquence de PE33 est illustrée). Comment le mercure exerce-t-il son action lorsqu'il provoque l'enlèvement de PE33. Exerce-t-il son action directement sur PE33? Existe-t-il des cystéines libres sur PE33? Le mercure exerce-t-il son action sur un autre polypeptide du PS II? Le mercure exerce-t-il son action sur un autre résidu d'acide aminé? Les résultats obtenus ici soulèvent toutes ces questions? Une section de la discussion sera consacrée à ces interrogations.

## CHAPITRE 4

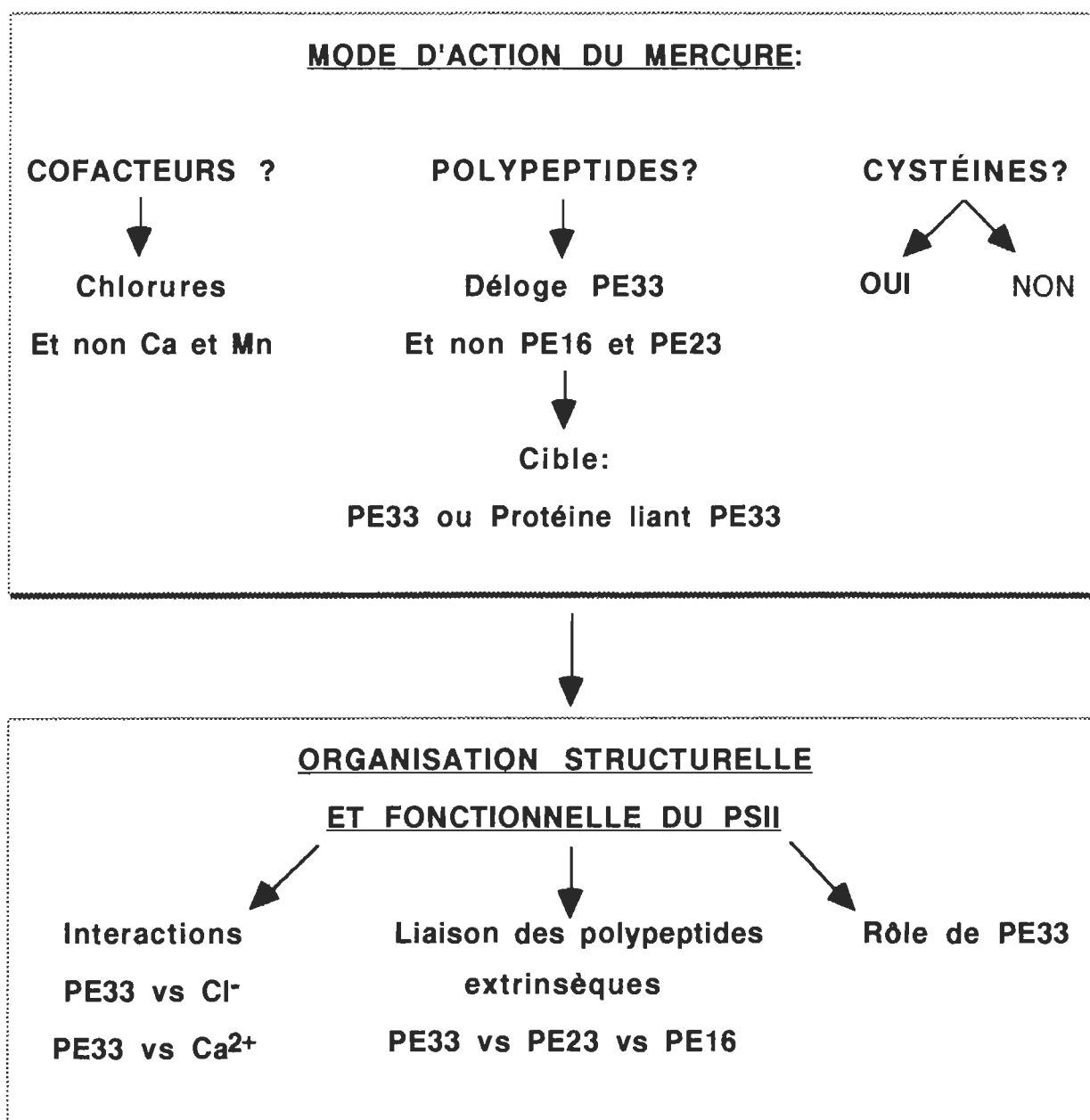
### DISCUSSION

Nul doute que l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à maintenant nous apportent de nouvelles et de précieuses informations sur le mode d'action du mercure sur le PS II. Mais par surcroît, ces résultats apportent de nouvelles informations sur l'organisation structurale du PS II. Une première partie de la discussion sera consacrée au mode d'action du mercure, alors que dans un deuxième temps les informations nouvelles sur l'organisation du PS II seront analysées. La figure 32, illustre l'organisation de la discussion et le lien entre chacune des sections.

#### 4.1- Mode d'action du mercure sur le PS II

Si on résume l'effet du mercure sur le PS II, le présent travail a montré qu'il exerce en tout ou en partie son effet sur le côté donneur du PS II, qu'il provoque la libération exclusive du polypeptide extrinsèque PE33, et que cet effet du mercure peut être renversé par des concentrations modérées de chlorure. Enfin, il demeure difficile de préciser si le mercure exerce son action sur PE33 directement ou sur une composante intrinsèque liant PE33. De même, il demeure difficile de préciser si le mercure modifie une ou des cystéines de réactivité spéciale ou un autre type de résidu d'acide aminé. Chacune de ces assertions sera discutée en détails.





**Figure 32.** Vue d'ensemble des résultats et des informations qu'ils apportent sur le mode d'action du mercure de même que sur l'organisation structurale et fonctionnelle du PS II. Chacun des items fera l'objet d'une section de la discussion.

#### 4.1.1- Le mercure provoque la libération de PE33

Si on répertorie dans la littérature l'ensemble des traitements provoquant la libération des polypeptides extrinsèques, on constate rapidement que très peu d'entre eux provoqueront la libération exclusive de PE33. Dans la grande majorité des cas, on y observera soit un relargage de PE16 et PE23, soit une libération de PE16, PE23 et PE33. Le **tableau 13** montre certains des traitements représentatifs répertoriés dans la littérature.

Ainsi, le mercure semble exercer son action d'une façon bien particulière en étant le seul traitement connu pouvant déloger PE33 sans déloger PE23 et PE16. On notera que les traitements n'utilisant que des composés ioniques à concentrations modérées provoquent la libération de PE16 et PE23 sans affecter PE33. On attribue ce phénomène à la nature électrostatique des liens entre PE16 et PE23 et le PS II. Des traitements à pH élevé, des traitements à l'urée, des traitements à haute température permettent de déloger PE33, ce qui a conduit à proposer la présence de ponts hydrogènes et de liens hydrophobes entre PE33 et son site de liaison, en plus des liens électrostatiques (Andersson et Åkerlund, 1987). Le mode d'action du mercure n'est probablement pas de nature électrostatique, si tel était le cas, PE16 et PE23 auraient aussi été délogés. De plus, la concentration à laquelle le mercure exerce son action est extrêmement faible (dans l'ordre du  $\mu\text{M}$ ). Le mercure semble plutôt exercer une action bien spécifique sur PE33 ou sur la ou les protéines liant PE33.

Tableau 13

Traitements destinés à déloger les polypeptides extrinsèques du PS II

TRAITEMENT	DEG. D'O <sub>2</sub> (% inhib.)	Polypept. libéré (%)			RÉFÉRENCE
		PE33	PE23	PE16	
1M Tris-HCl, pH 9,3	100	100	100	100	Kuwabara et Murata, 1982
0.25M NaCl, pH 7,4	75	0	70	85	Åkerlund et coll., 1984 Andersson et coll., 1984
1M NaCl, pH 6,5	60	0	100	100	Miyao et Murata, 1983
1M CaCl <sub>2</sub> , pH 6,5	98	100	100	100	Ono et Inoue, 1983
2,6 M Urée + 10 mm NaCl	97	97	91	100	Miyao et Murata, 1984
2,6 M Urée	97	100	81	78	Miyao et Murata, 1984
50 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	0	40	60	Beauregard, 1988
25 mM Tricine NaOH pH 9,3	87	56	52	73	Kuwabara et coll., 1983
NH <sub>2</sub> OH	93	5	25	40	Tamura et Cheniae, 1987 Miller et Brudvig, 1989
ZnCl <sub>2</sub> , 5 mM	100	0	80	100	Miller, 1985
HgCl <sub>2</sub> 10 µM	80 %	40	0	0	Bernier et Carpentier, 1995

D'après Miyao et Murata, 1985; Andersson et Åkerlund, 1987; Bernier et Carpentier, 1995.

Un fait demeure intrigant cependant, pourquoi le mercure a-t-il provoqué le relargage d'un maximum d'environ 50% de la protéine et pas plus (voir **figure 26**). Des auteurs ont déjà proposé l'existence de sites d'affinités différentes pour la liaison de PE33 sur le PS II. Bowlby et Frash (1984) ont observé un site de haute affinité et un site de faible affinité pour la liaison de PE33 kDa sur des PS II traitées au  $\text{CaCl}_2$  (i.e. départis de PE33, PE23 et PE16). Le fait qu'on ne puisse déloger complètement PE33 (uniquement 50%) en présence de mercure pourrait-il être le reflet de l'existence de sites d'affinité différente? Le mercure pourrait-il exercer son action sur un seul type de site? Dans le même ordre d'idée, Camm et coll. (1987) ont démontré la ténacité de l'association de PE33 avec le PS II, et que nombre de traitements destinés à le déloger ne pouvaient le faire entièrement. Les quantités résiduelles de PE33 variaient entre 82% et 10%, évalués par marquage immunologique, une méthode plus sensible. Les traitements les plus efficaces s'effectuaient en plusieurs étapes avec des composés différents. Par exemple, le traitement proposé par Miyao et Murata (1984) utilise dans un premier temps le NaCl (affecte les liaisons ioniques) et par la suite de l'urée (affecte les ponts hydrogènes). Celui de Camm et coll. (1987) utilise d'abord un détergent non-ionique, l'octylglucoside et par la suite un composé ionique le Tris. Ces auteurs suggèrent donc l'existence de plusieurs types d'interaction entre PE33 et la membrane, de nature hydrophobe et de nature ionique. Ainsi, il est possible que le mercure affecte un seul type de liaison et ne déloge ainsi qu'une partie des PE33.

Il ne faut pas perdre de vue cependant, qu'au delà d'une certaine concentration de mercure (10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ ), de moins en moins de PE33 était délogé (**figure 26**). Ça laisse supposer l'existence d'une interaction chimique particulière entre le mercure et le PS II. Il est possible qu'au delà d'une certaine concentration de mercure, il puisse survenir des réactions de pontage (crosslinking) qui renforcent la liaison de PE33 à son site intrinsèque plutôt que de provoquer sa libération, tout en le maintenant disfonctionnel. Une étude sur l'albumine (Jacobson et Turner, 1980) avait montré qu'à faible pH le mercure pourrait se lier à un groupement sulfhydryl et provoquer la formation d'un dimère. Peut-être sommes-nous en

présence d'un phénomène semblable? Dans ce cas, le fait qu'on ne puisse déloger que 50% de PE33 résulterait d'une interaction chimique non spécifique et ne serait pas nécessairement le reflet d'une hétérogénéité de sites de liaison. Étant donné que PE33 soit de moins en moins relargué à de fortes concentrations de mercure nous porte à opter pour une interaction chimique particulière entre ce métal et PE33 plutôt que pour l'existence d'une hétérogénéité des sites de liaison de PE33.

Enfin, cette interaction chimique proposée ici qui maintiendrait PE33 lié au PSII à de fortes concentrations de mercure, sans qu'il soit toutefois fonctionnel, ne pourrait-elle pas être responsable du maintien de PE16 et PE23 sur le PSII. Il est permis d'en douter. En effet, si on consulte le **tableau 14**, il est démontré que lorsque PE16, PE23 et PE33 sont délogés de la membrane, des concentrations de chlorure de l'ordre de 100 mM et des concentrations de calcium de 5 à 10 mM sont nécessaires pour restaurer l'activité. Si dans notre cas, PE16 et PE23 étaient maintenus "artificiellement" liés au complexe par le mercure et qu'ils n'étaient pas fonctionnels on aurait dû observer des besoins semblables en ions chlorures et en ions calcium. Cependant, nous observons que des concentrations de chlorure aussi faibles que 10 mM permettent de renverser l'effet inhibiteur du mercure et qu'aucune quantité de calcium n'est requise. Ce résultat nous porte à penser que le mercure exerce bel et bien une action spécifique sur la liaison de PE33 et que PE16 et PE23 sont maintenus liés d'une façon intégrale et fonctionnelle à la membrane.

Ainsi, même si le comportement en fonction de la concentration de mercure demeure difficile à expliquer, le fait qu'on puisse déloger PE33 sans déloger PE23 et PE16 présente un grand intérêt, comme il en sera discuté à la section 4.2.

#### 4.1.2- L'effet du mercure peut être renversé par les chlorures

Le fait que l'inhibition causée par le mercure soit levée en présence de chlorure constitue aussi un résultat exceptionnel et très intéressant. En effet, il a été maintes fois démontré par le passé que l'enlèvement des polypeptides extrinsèques du PS II provoquait une perte d'activité de dégagement d'oxygène qui pouvait être restaurée par l'ajout de concentrations modérées de chlorure et de calcium. Le tableau 14 montre les différentes concentrations requises pour restaurer l'activité en fonction des polypeptides délogés.

**Tableau 14**

**Concentrations de chlorure et de calcium nécessaires pour une activité de dégagement d'oxygène optimale**

COMPLEXE	[Cl <sup>-</sup> ]	[Ca <sup>2+</sup> ]
16-23-33 kDa	1 - 30 mM	0 - 5 mM
<del>16</del> -23-33 kDa	3 - 30 mM	0 - 5 mM
<del>16-23</del> -33 kDa	10 - 50 mM	5 - 10 mM
<del>16-23-33</del> kDa	100 - 200 mM	5 - 10 mM
<b>16-23-<del>33</del> kDa</b>	<b>5-10 mM</b>	<b>0 mM</b>

Les polypeptides marqués d'un trait sont absents du complexe.

D'après Miyao et Murata, 1985 et Kuwabara et coll., 1985; Bernier et coll., 1993

Étant donné que l'activité du PS II peut être récupérée par l'ajout de ces ions, il a été proposé que les polypeptides extrinsèques, plutôt que de jouer un rôle catalytique dans la fonction du PS II, jouent un rôle structural ou régulateur. On pense que ces polypeptides sont impliqués dans le maintien de l'intégrité structurale du PS II et favorisent ainsi une

liaison adéquate de ces cofacteurs. En fait, on propose de plus en plus que les trois polypeptides extrinsèques puissent former une enclave (un sous-compartiment) séparée de l'espace luminal et qui facilite la liaison des cofacteurs ou la création d'une concentration locale en calcium et en chlorure près du site de photooxydation de l'eau (Hansson et Wydrzinski, 1990; Vermass, 1993).

Ce qui devient fort intéressant dans la présente étude, c'est que les concentrations de TMACl nécessaires pour restaurer l'activité du PS II suite à un traitement au mercure sont de l'ordre de 10 mM (voir **figure 2 2**), cependant lorsque PE33 est délogé en même temps que PE16 et PE23, les besoins en chlorure pour restaurer l'activité sont 10 fois plus élevés. De plus, on note lorsque les trois polypeptides sont délogés que les besoins en calcium sont aussi modifiés alors que dans le cas présent où seulement PE33 est délogé, seuls les besoins en chlorure sont affectés. Quel est le sens d'un tel résultat? À prime abord, il apparaît évident que nous sommes en présence d'un effet où le PS II est moins désorganisé que lors des traitements conventionnels où l'enlèvement de PE33 nécessitait l'enlèvement concomitant de PE16 et PE23. Beaucoup de conclusions quant au rôle des cofacteurs et des polypeptides extrinsèques ont été tirées à la lueur de telles études, mais il devient difficile de préciser le rôle spécifique de PE33 si lors de son détachement de la membrane on doit déloger aussi PE16 et PE23. Ainsi, grâce à la présente étude, c'est la première fois qu'on peut déloger exclusivement PE33, cet enlèvement exclusif de PE33 n'a provoqué qu'une altération de l'équilibre des chlorures et non du calcium. Un tel résultat apporte des indications quant au lien qu'entretient PE33 avec ces cofacteurs. Il en sera question à la section 4.2.2.

Dans cette section sur le mode d'action du mercure on doit se demander comment le mercure a-t-il provoqué une altération de l'équilibre des chlorures? A-t-il interagit directement sur un site de liaison des chlorures ou a-t-il interagit à un autre site de la protéine

cible modifiant ainsi sa conformation et occasionnant un changement d'affinité du PS II pour les chlorures? Les analyses enzymatiques de nos données nous ont révélé une inhibition de type mixte (voir section 3.2). La composante d'inhibition compétitive partielle indique que le mercure et le chlorure se lient à des sites différents sur le PS II et que le chlorure a une affinité plus faible pour le PS II lorsque le mercure est lié au complexe ( $K_m$  plus élevé). Ainsi, nos résultats montrent que le mercure exerce son action à un site différent de celui de la liaison des chlorures, cependant son action semble avoir causé un changement conformationnel très spécifique ayant modifié la liaison des chlorures ainsi que la liaison de PE33 sur le PS II.

On doit alors se demander si le mercure exerce son action en provoquant d'abord la libération de PE33 et causant ainsi une déstabilisation du complexe ayant pour conséquence une modification de la liaison des chlorures. Ou encore, si le mercure exerce son action en provoquant un changement conformationnel qui altère d'abord la liaison des chlorures, le complexe étant ainsi déstabilisé, PE33 serait délogé. Il s'agit ici d'une question d'oeuf ou de poule.... mais cela dénote une certaine ambiguïté quant à la fonction des cofacteurs et des polypeptides extrinsèques. En effet, si on considère la fonction structurelle des polypeptides extrinsèques, on sait qu'ils sont essentiels pour la liaison adéquate des cofacteurs près du site de photooxydation de l'eau. Ils pourraient fournir des sites de liaison pour les cofacteurs, ou encore former une enclave favorisant la liaison des cofacteurs à des sites intrinsèques ou tout simplement favorisant la concentration de ces cofacteurs près du centre catalytique (Vermass, 1993). La première alternative serait alors plausible, c'est-à-dire que le mercure pourrait provoquer d'abord un enlèvement de PE33 qui aurait comme conséquence de déstabiliser le complexe d'une façon telle que les chlorures ne peuvent pas se lier adéquatement au PSII et exercer leur fonction dans le processus de dégagement d'oxygène. Cependant, si on considère le rôle des cofacteurs, on leur propose soit une fonction "catalytique" dans le processus soit une fonction "structurelle" (voir section 1.2.3.3).



Certains auteurs suggèrent que par des interactions électrostatiques avec le PSII, le chlorure et le calcium pourraient jouer un rôle important dans le maintien de l'organisation des protéines pour un fonctionnement optimal du PSII (Wydrizinski et coll., 1990; Witt, 1991). Ces mêmes auteurs questionnent la possibilité que ces cofacteurs soient directement impliqués dans le processus catalytique. Dans ce contexte, il est aussi probable que le mercure ait agi d'abord en modifiant l'affinité des chlorures pour le PSII et que les conséquences aient été une déstabilisation du complexe et l'enlèvement de PE33. Il est donc difficile de trancher entre les deux alternatives mais on sait que ces deux effets du mercure sont étroitement reliés car nous avons démontré que le chlorure protège ou renverse l'effet du mercure sur l'activité de dégagement d'oxygène ainsi que sur l'enlèvement de PE33. Ainsi, on se doit encore de conclure que nous sommes en présence d'un effet très spécifique du mercure car cela a entraîné une modification modeste des besoins en chlorure, aucune modification des besoins en calcium et l'enlèvement exclusif de PE33.

#### 4.1.3- Est-ce que le mercure modifie une ou des cystéines du PS II?

L'analyse effectuée dans la section 3.4 avec les divers modificateurs de cystéines avait pour but de vérifier si le mercure inorganique tel qu'employé tout au long de cette étude pouvait modifier une ou des cystéines du PS II compte-tenu de son affinité exceptionnelle pour ce résidu ( $K=10^{41.5}$ ). L'obtention de résultats semblables pour l'ensemble des modificateurs de groupements -SH libres (NEM; PCMB; AI;  $HgCl_2$ ) nous auraient permis de conclure sans équivoque en l'interaction du mercure avec une ou des cystéines du PS II. Comme mentionné précédemment, nous sommes en présence d'un amalgame de résultats où seuls les mercuriels ( $HgCl_2$  ou PCMB) ont inhibé le PS II (voir tableau 12). À la lueur d'un tel résultat où des agents comme le NEM et l'acide iodoacétique n'ont pas inhibé le PS II, on peut soit proposer: i- que le mercure n'agit pas sur une cystéine du PS II mais modifie plutôt un autre résidu d'acide aminé ou ii- le mercure agit sur une ou des cystéines du PS II présentant une réactivité ou une accessibilité particulière pour le mercure.

i- *Le mercure pourrait-il modifier un résidu d'acide aminé dans le PS II autre que la cystéine?* On pense immédiatement par exemple au résidu histidine pour lequel le mercure présente une affinité considérable ( $K=10^{21}$ ) même si elle est moindre que pour le mercure ( $K=10^{41.6}$ ). D'autres équipes ont étudié l'effet du DEPC sur le PS II, un modificateur des résidus histidines, dont celle de Tamura, Ikeuchi et Inoue (1989). Sur des FMRPSII intacts, le DEPC ne provoquait qu'une faible inhibition de l'activité de dégagement d'oxygène après de longues incubations (20% après 60 minutes). Cependant, lorsque les polypeptides extrinsèques et le manganèse étaient délogés, on notait une inhibition considérable par le DEPC (80% après 30 minutes). Ces auteurs ont conclu que le site modifié par le DEPC était peu accessible sur des PS II intacts et largement exposé lorsque les polypeptides extrinsèques et le manganèse sont absents du complexe. Sur nos préparations l'effet du mercure est

dramatique sur des PS II intacts (80% d'inhibition en 5 minutes pour une concentration aussi faible que 20  $\mu\text{M}$ ; voir figure 17) et l'enlèvement de PE33 était identique en absence ou en présence de PE16 et PE23 (voir figure 28). Ces résultats nous permettent de douter de la possibilité que le mercure modifie une histidine cruciale du PS II. Nombre de protéines du PS II portent des histidines (Gray et coll., 1989) et nous ne pouvons exclure catégoriquement cette éventualité, mais elle nous apparaît moins probable. Cependant, le mercure présente une affinité importante pour d'autres résidus et on ne peut totalement exclure ces possibilités.

*ii- Le mercure peut-il agir sur une ou des cystéines du PS II présentant une réactivité ou une accessibilité particulière pour ce métal?* D'abord, il est important de préciser que la gamme de composés utilisés ne modifient pas les groupements sulfhydryls libres de la même façon. En effet, les mercuriels interagissent avec les -SH en formant un lien "mercaptide", alors que le NEM provoque une alkylation des -SH et l'acide iodoacétique transforme le résidu cystéine en carboxyméthylcystéine (Lundlab et Noyes, 1984; Lundlab, 1995). Est-il possible que la cystéine "déterminante" ne soit sensible qu'à un seul type de modification? Certains résultats obtenus par d'autres équipes sur d'autres systèmes membranaires nous permettent de le penser. En effet, je citerai ici quelques études sur des transporteurs membranaires ainsi que sur des récepteurs membranaires, où on a observé une réactivité différentielle selon les modificateurs utilisés. D'abord, Terramani et coll. (1988) ont observé des résultats semblables aux nôtres lors d'études de liaison du AMPA sur des membranes synaptiques. Seuls les mercuriels ( $\text{HgCl}_2$ , PCMB et PCMBs) ont influencé la liaison de ce composé sur la membrane. Les autres modificateurs de groupements sulfhydryls (NEM, A.I. et  $\text{CdCl}_2$ ) n'ont eu aucun effet sur la liaison. De plus, ils ont observé que ces agents protégeaient de l'action des mercuriels. Ils ont alors proposé l'existence de groupements sulfhydryls distincts ayant des réactivités différentes selon l'agent utilisé, plutôt que

d'attribuer le résultat à un phénomène d'accessibilité. Dans le même ordre d'idée, Campbell et coll. (1992) lors de leurs travaux sur le système L de transport des acides aminés chez les cellules d'ovaire ont observé que le PCMBs et le NEM pouvaient inactiver ce système alors que l'acide iodoacétique n'avait aucun effet. De plus, ils ont observé que l'inhibition causée par le NEM n'était pas sensible au pH et ne pouvait être atténuée par la présence de substrat contrairement à l'inhibition causée par le PCMBs qui était "protégeable par le substrat". Les auteurs concluent que les deux réactifs agissent sur des groupements sulfhydryls différents. Considérant ces données, il apparaît donc probable que dans le cas présent, le  $\text{HgCl}_2$  (ou  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ) modifie une cystéine hautement réactive et cruciale pour le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle du PS II. Les autres composés (NEM, A.I) n'ont soit pas accès à cette cystéine ou ne réagissent pas avec cette dernière compte-tenu de son microenvironnement. On se rappellera que l'intérêt de l'approche de modification chimique réside dans le fait que les résidus d'acides aminés impliqués dans la fonction biologique d'une protéine sont dans un microenvironnement qui leur confèrent une réactivité exceptionnelle par rapport aux autres résidus situés ailleurs dans la protéine (Riordan, 1979).

Le fait que  $\text{HgCl}_2$  provoque la libération de PE33 et le PCMBs la libération de PE16, PE23 et PE33 (voir tableau 1 2) demeure intrigant. Il peut s'agir aussi d'une différence de réactivité ou d'accessibilité entre les deux composés de mercure, un étant sous la forme inorganique et l'autre sous la forme organique. Ainsi, sans pouvoir l'affirmer sans équivoque, nous croyons que le mercure inorganique ( $\text{HgCl}_2$  ou  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ) agit sur le PS II en modifiant une cystéine déterminante pour le maintien de la structure et de la fonction du PS II.

#### 4.1.4 - Quel polypeptide du PS II est affecté par le mercure?

Si on admet qu'il y a de fortes chances que le mercure modifie une ou des cystéines du PS II, plusieurs polypeptides deviennent candidats à la modification par le mercure (voir le tableau 5). Il serait tentant de proposer PE33 comme cible du mercure étant donné que ce polypeptide est délogé de la membrane en présence de ce métal et que ce polypeptide de 247 acides aminés porte deux cystéines. Cependant la question n'est pas si simple et la possibilité que le mercure agisse sur un polypeptide intrinsèque liant PE33 et induise des changements conformationnels provoquant la libération de PE33 est aussi à considérer. La figure 33, illustre la problématique

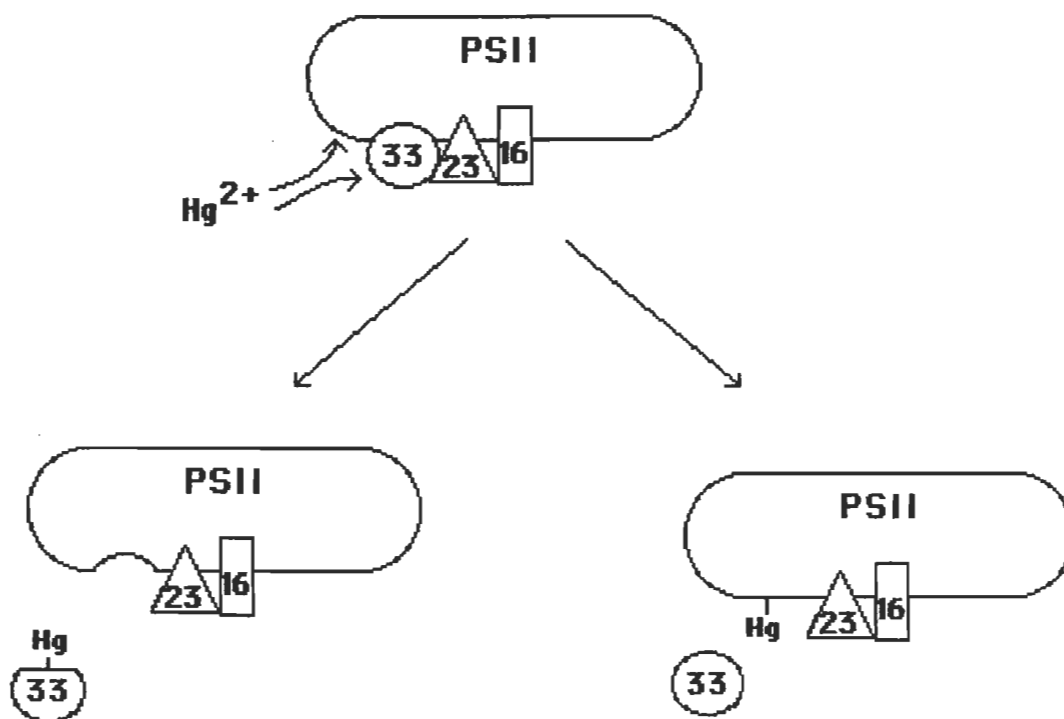
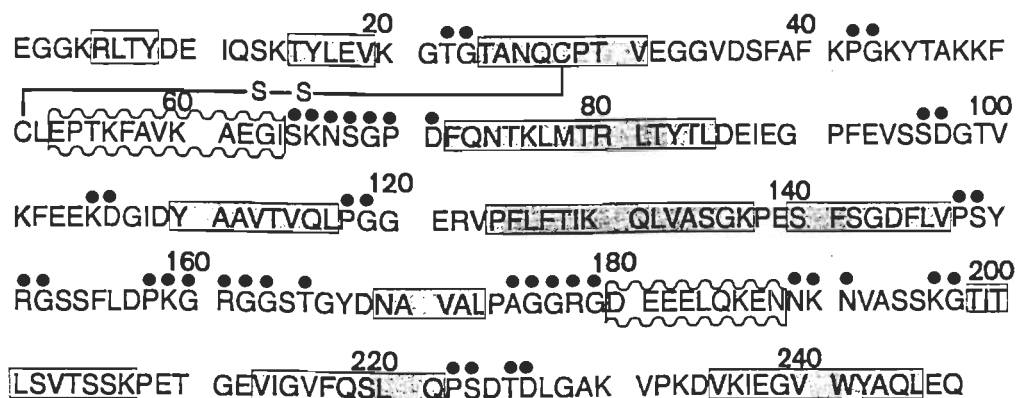


Figure 33. La cible du mercure: PE 33 ou un polypeptide intrinsèque liant PE33?

i- *Est-ce que le mercure peut agir directement sur PE33?* Il est tentant à prime abord de répondre par l'affirmative étant donné que PE33 porte deux cystéines et qu'il est délogé en présence de mercure. Cependant, certains auteurs (Tanaka et Wada, 1988; Camm et coll., 1987) ont suggéré que les deux cystéines (Cys 28 et Cys 51) présentes sur PE33 étaient liées entre elles par un pont disulfure (voir figure 34), alors elles ne devraient pas être accessibles pour être modifiées par le mercure, ce dernier réagissant avec les -SH libres des cystéines.



**Figure 34.** Séquence en acides aminés de PE33. (Tiré de Xu, Nelson et Bricker, 1994)

Un ensemble de résultats dans la littérature vont dans ce sens, i.e tendent à démontrer l'existence d'un pont disulfure (ou l'absence de groupements -SH libre) et son importance pour le maintien de l'intégrité fonctionnelle du PS II. D'abord sur des FMRPSII, Tanaka et Wada (1988) ont tenté de détecter la présence de groupements -SH libres à l'aide du PCMB, il n'ont détecté aucun groupement -SH et n'ont observé aucun effet sur l'activité de dégagement d'oxygène. Camm et coll. (1987) ont obtenu des résultats similaires avec le PCMB et le NEM. Ensuite, un traitement des FMRPSII avec le DTE, un analogue du DTT a conduit à une inhibition de l'activité de dégagement d'oxygène, laquelle pouvait être restaurée suite à une réoxydation du PSII (les ponts disulfures sont reformés). Ce résultat indiquait la présence d'un pont disulfure essentiel au maintien de la fonction du PS II (Irrgang et coll., 1992). Camm et coll. (1988) observaient suite à un traitement au DTT des FMRPSII un déplacement dans la migration électrophorétique de PE33 (31 kDa vers 31.5 kDa). Ils ont alors proposé que le bris d'un pont disulfure sur PE33 occasionne un allongement de la protéine qui se manifeste par un poids moléculaire apparent plus élevé. Cependant, dans les cas précédents comme dans le nôtre (tableau 12), un traitement au DTT des FMRPSII n'occasionne pas une libération de polypeptide. Des expériences ont aussi été effectuées sur le polypeptide PE33 isolé. Le dosage des -SH libres par le DTNB s'est avéré négatif (Tanaka et Wada, 1988). Camm et coll. (1987) ont montré le même déplacement dans la migration électrophorétique (31 kDa vers 31.5 kDa) suite à un traitement au DTT, mais à des concentrations 10 fois plus faibles. Enfin, Tanaka et Wada (1988) ont traité PE33 au 2-mercaptoethanol (agent réducteur brisant les ponts disulfures) pour ensuite tenter des expériences de reconstitution. Suite au traitement, PE33 ne pouvait se lier au PS II et une faible activité de dégagement d'oxygène était observée. Cependant, si PE33 était réoxydée (ponts disulfures reformés), le polypeptide pouvait de nouveau se lier au PS II et l'activité de dégagement d'oxygène était rétablie. Enfin, une étude récente de mutation a été effectuée chez la cyanobactérie *Synechocystis* sp. où la cystéine en position 20 (Cys-20) a

été substituée par une sérine, justement dans le but d'empêcher la formation d'un pont disulfure entre Cys-20 et Cys-45 (Burnap et coll., 1994) . Chez ce mutant on n'a observé aucune accumulation de la protéine MSP (pour "manganese stabilizing protein" - l'équivalent de PE33 chez les plantes supérieures) ainsi qu'une activité de dégagement d'oxygène atténuée (42%). L'ensemble de ces études montre l'existence d'un pont disulfure chez PE33 et son importance dans le maintien de son intégrité structurelle et fonctionnelle.

Cependant, quelques faits demeurent étranges. D'abord sur les traitements au DTT: un traitement des FMRPSII inhibe le dégagement d'oxygène, mais n'occasionne pas la libération de polypeptides extrinsèques (Irrgang et coll., 1992; Camm et coll, 1987). Cependant, un traitement au DTT de PE33 isolé empêche sa liaison sur le PS II (Tanaka et Wada, 1988). Comment expliquer cette différence? Des concentrations de DTT jusqu'à 100 mM n'ont pas entraîné de libération de polypeptide sur les FMRPSII (Camm et coll., 1987). Peut-il s'agir d'une question d'accessibilité du pont disulfure selon que la protéine soit liée à la membrane ou en solution? Peut-il s'agir du degré de réduction de ce pont disulfure selon que la protéine soit liée à la membrane ou en solution ou même selon l'état fonctionnel de la protéine au cours de sa modification? Ou simplement, le bris du pont disulfure lorsque la protéine est liée à la membrane rend cette dernière non fonctionnelle sans la déloger de son environnement natif compte-tenu des nombreux liens qu'elle entretient avec nombre de protéines. On pense que PE33 maintient une forme relativement allongée et qu'il est lié à plusieurs protéines du PS II (D1 - D2 - CP47 - CP43 - PE23 et PE 16) (voir section 1.2.2.1).

Autre résultat intrigant: dans l'ensemble des autres études aucun agent modificateur des -SH libres n'a eu d'effet sur le PS II (ni PCMB, ni NEM, ni DTNB). Dans notre étude, le



NEM, et l'acide iodoacétique et le PCMB<sup>7</sup> n'ont effectivement pas eu d'effet sur le PS II, cependant le HgCl<sub>2</sub> et le PCMBS (un analogue du PCMB supposément moins liposoluble) ont eu un effet marquant. Les résultats précédents concernant le titrage des -SH libres (avec PCMB et DTNB) se sont avérés négatifs. Serait-ce relié à une question d'accessibilité ou de réactivité des composés? Remarquons que les agents modificateurs de -SH libres qui ont causé un effet marqué sur nos préparation (HgCl<sub>2</sub> et PCMBS), n'avaient pas été utilisés lors des études antérieures. Le PCMBS est un agent plus hydrosoluble que le PCMB et PE33 est une protéine largement hydrophile. Y aurait-il donc une portion des cystéines chez PE33 (sous forme réduite) ayant une réactivité très spécifique pour quelques modificateurs seulement et qui sont déterminantes pour sa liaison au PS II ou pour sa fonction? Il est permis de se poser la question.

De plus, des études intéressantes sur un transporteur membranaire ont montré que l'interconversion entre la forme réduite (-SH libres) et la forme oxydée (pont disulfure) pouvait survenir au cours du processus de translocation et que les groupements sulfhydryls pourraient être localisés au site de liaison du substrat (Zimmerman et coll., 1991). Dans le même ordre d'idée, Kanner et coll. (1992) ont montré que l'état d'oxydoréduction des thiols intracellulaires influence la réponse des cellules T aux stimuli extérieurs. En fait, la modulation de l'activité de certains enzymes selon le statut redox de leurs cystéines est un phénomène observé dans plusieurs systèmes biologiques (Buchanan et coll., 1994) (nous en décrivons quelques exemples à la section 4.2.3). On sait que PE33 est reconnu comme une protéine stabilisant le manganèse, le statut de ses cystéines pourrait-il changer selon la progression des états S, c'est-à-dire lorsque l'état d'oxydation des manganèses change? Une telle hypothèse serait fort séduisante. D'abord, les résultats précédents ne seraient peut-être

---

<sup>7</sup> Par besoin de comparaison, nous avons effectué des études supplémentaires avec le PCMB et dans l'écart de concentration utilisée (jusqu'à 1 mM) il n'a exercé aucun effet.

pas si contradictoire et seraient plutôt attribuables aux conditions expérimentales et à l'état fonctionnel du PSII. De plus, la possibilité qu'il y ait alternance dans le statut d'oxydoréduction des cystéines du PSII apporterait une vision intéressante quant au rôle de PE33 dans la fonction du PS II (voir section 4.2.3).

Ainsi, considérant toutes ces données PE33 demeure une cible plausible du mercure, mais nous ne pouvons exclure la possibilité que ce métal exerce son action sur d'autres protéines liant PE33.

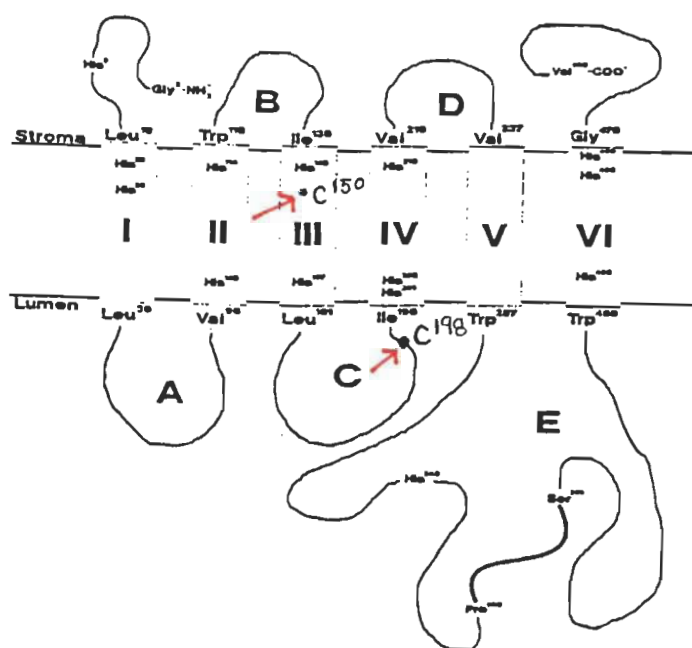
*ii- Est-ce que le mercure peut agir sur d'autres polypeptides du PS II portant une ou des cystéines?*

Il a été démontré par une variété d'études que PE33 se lie à plusieurs protéines intrinsèques du PS II ainsi qu'aux polypeptides extrinsèques PE16 et PE23. En effet, des études de pontage (Bowlby et Frasch, 1986; Machold, 1986; Milner et coll., 1987; Enami et coll., 1987, 1989, 1990, 1991, 1992), de digestion à l'aide de protéases (Isogai, Yamamoto et Nishimura, 1985) et des études immunologiques (Ljungberg et coll., 1984, Ivey et Berg, 1985, Aoki et coll., 1986, Camm et coll., 1987) ont montré que PE33 peut se lier directement au centre réactionnel formé par D1|D2, aux antennes proximales CP47 et CP43, au cyt *b*-559 ainsi qu'à PE16 et PE23. Si on observe en détails la séquence en acide aminé de chacune de ces protéines, on peut voir que quatre d'entre elles portent des cystéines (voir tableau 5). Les figures 35 et 36 montrent des modèles pour ces quatre polypeptides intrinsèques où les cystéines sont mises en évidence. On retrouve même quelques cystéines sur la face luminale du thylacoïde (pour CP47 et D2), c'est-à-dire du côté où se lie PE33. Il devient donc très plausible d'imaginer une interaction entre le mercure et une cystéine de CP47 ou de D2. Une telle interaction pourrait altérer directement le lien entre

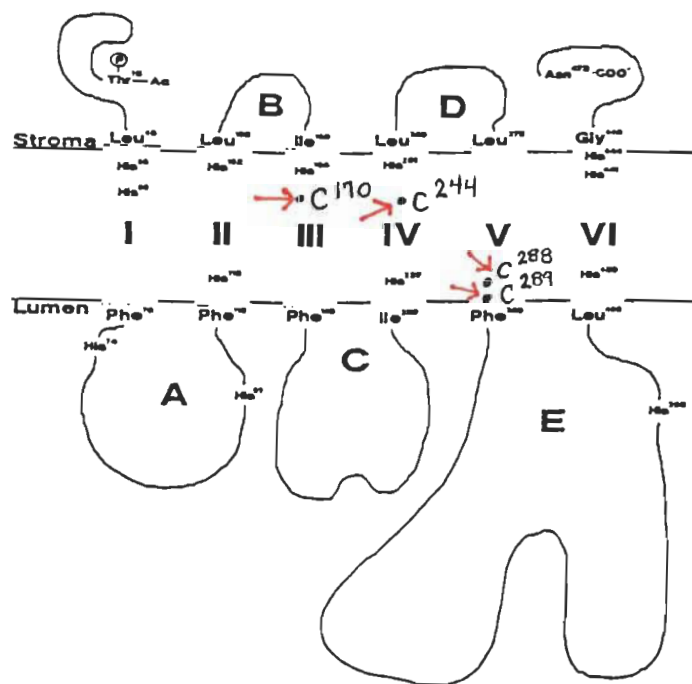
PE33 et la protéine modifiée ou indirectement en induisant un changement conformationnel qui causerait le relargage de PE33. Il n'est pas impensable non plus que le mercure agisse sur les autres polypeptides liant PE33. Chacune des possibilités d'interaction entre le mercure et ces polypeptides sera examinée en détails à la lueur des données disponibles dans la littérature.

Le mercure vs CP47?: Des études de mutation dirigée sur CP47 (Putnam-Evans et Bricker, 1994; Vermass et coll., 1987; Bricker et coll., 1988; voir Vermass et coll., 1993 pour une revue), plus spécifiquement sur des résidus hautement conservés de la boucle E de la protéine (voir **figure 3 5**), ont conduit à des mutants ayant une activité de dégagement d'oxygène atténuée, une PE33 déstabilisée et des besoins en chlorure altérés. Les auteurs proposent que dans ces conditions, le PS II lie plus difficilement PE33, ce qui déstabilise le complexe de manganèse et altère l'activité du PS II. Ils proposent même que CP47 offre un ou des sites de liaison pour le chlorure. CP47 devient donc un candidat très plausible comme site d'action du mercure si on considère que notre modification a en effet causé le relargage de PE33 et a modifié les besoins en chlorure. De plus, un fait intéressant, Frankel et Bricker (1992) ont proposé que les résidus 300 à 420 de la boucle E soient masqués par PE33 étant donné que cette région ne pouvait être accessible pour des marquages immunologiques ou des modifications chimiques à moins que PE33 ne soit délogé. Le site de liaison pour PE33 sur CP47 serait situé entre les résidus 360 et 440. Il devient séduisant de penser que la cystéine située sur la boucle C, soit accessible à la modification par le mercure et qu'un changement conformationnel de la protéine désorganise le site de liaison situé sur la boucle E. Nul doute que des études de mutation dirigée sur la cystéine 198 de la protéine présenteraient un grand intérêt.

## CP47



## CP43



**Figure 35.** Séquence en acides aminés des polypeptides CP47 et CP43 (D'après Bricker, 1990)

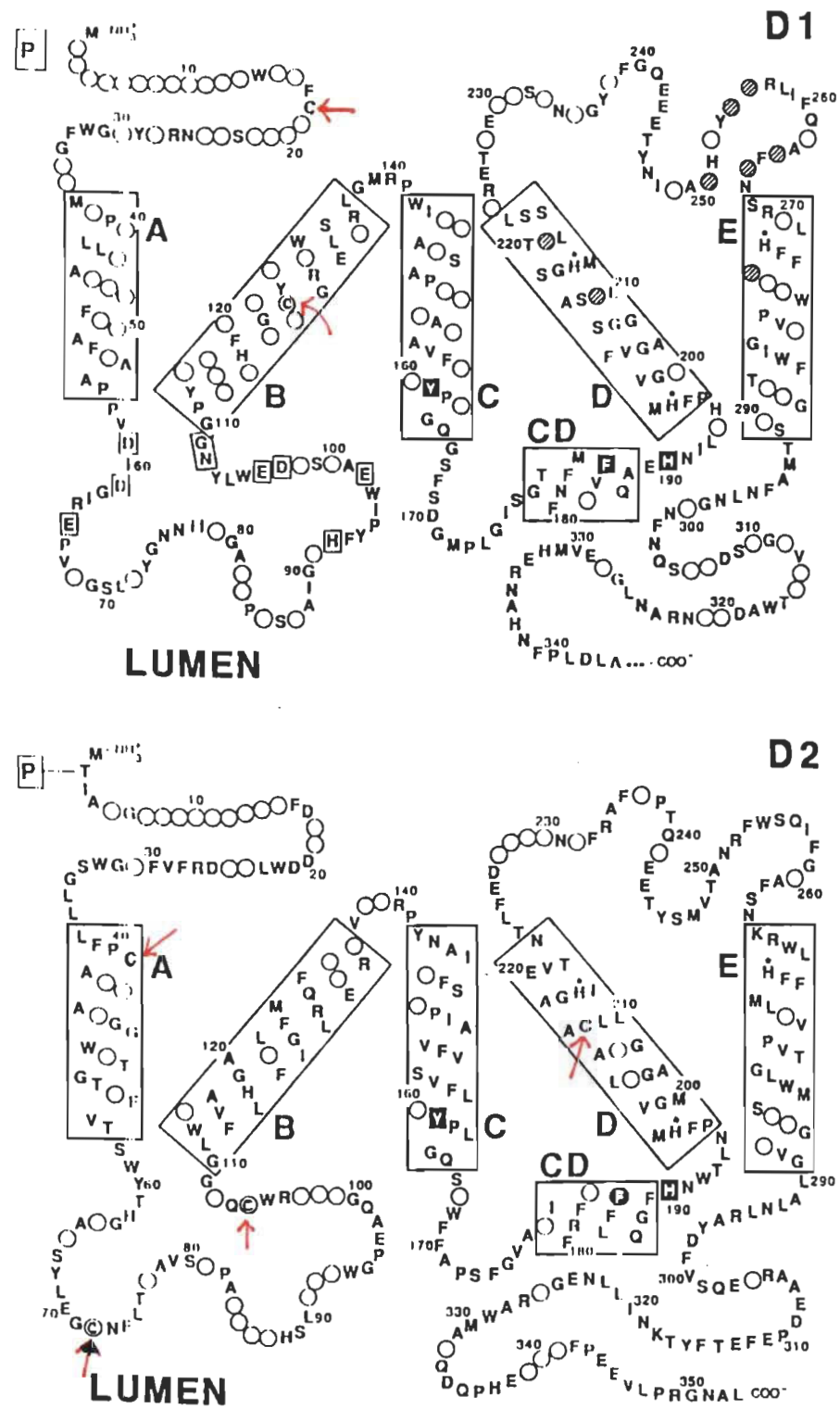


Figure 36. Séquence en acides aminés des polypeptides D1 et D2 (D'après Svensson et coll., 1991; Andersson et Styring, 1991)

Le mercure vs D2? La protéine D2 demeure aussi une candidate à la modification, deux de ses cystéines sont situées sur la face luminale du PSII. Reste à savoir si ces cystéines sont accessibles à la modification, on pourrait s'attendre qu'elles soient masquées par PE33 lorsque ce dernier se lie à D2.

Le mercure vs D1? Même D1 qui porte une cystéine sur sa face stromatique n'est pas à exclure si l'on s'inspire des travaux de Etienne et Kirilovsky (1993). Ces auteurs ont montré que des mutations survenant près du site Qb sur D2 (sur la face stromatique) avaient des répercussions sur le dégagement d'oxygène (face luminale), un effet qu'ils ont qualifié de "long range". Dans le même ordre d'idée, Rashid et Carpentier, (1990), ont montré que l'enlèvement des polypeptides extrinsèques de 16 et 23 kDa sur la face luminale du PSII modifiait la sensibilité du complexe à l'atrazine, un herbicide qui exerce son action sur la face stromatique du PSII. Il n'est donc pas complètement farfelu d'imaginer un effet transmembranaire où une modification de D1 sur la face stromatique entraînerait des conséquences sur la face luminale du thylacoïde.

Le mercure vs CP43? Les quatre cystéines portées par CP43 semblent enfouies dans la membrane quoique C288 et C289 sont situées assez près de la face luminale. On note une très grande analogie dans la séquence en acides aminés ainsi que dans la topographie de CP43 et CP47 (Sayre et Wrobel-Boerner, 1994). Il n'est donc pas impensable que l'anse E de CP43 soit aussi impliquée dans la liaison de PE33. Une altération des cystéines C288 et C289 pourrait ainsi entraîner un changement conformationnel provoquant la libération de PE33. Cette possibilité est aussi à considérer.

Le mercure vs cyt *b559* ? Larsson et coll. (1984) ont suggéré qu'il puisse exister un lien entre PE33 et le cyt *b559*. Les deux sous-unités de 4 et 9 kDa ne portent pas de cystéines, mais nous ne pouvons pas exclure totalement la possibilité d'une interaction avec un autre résidu qui pourrait occasionner un changement conformationnel causant la libération de PE33. Samson (1989) a observé un impact du mercure sur l'oxydation du cyt *b559* au cours du transport cyclique d'électrons autour du PS II, donc cette possibilité reste à considérer.

Le mercure vs PE23 et PE16? Dans la littérature, des études ont aussi montré des liaisons possibles entre PE33 et PE16 et PE23 (Miyao et Murata, 1989; Enami, 1989). Il apparaît moins probable qu'une interaction entre le mercure et PE23 ou PE16 puisse provoquer la libération de PE33. Dans un premier temps, expérimentalement nous avons démontré que l'absence de PE16 et PE23 ne modifiait en rien l'effet du mercure sur le relarguage de PE33 (voir **figure 28**) et dans un deuxième temps, ces polypeptides ne portent pas de cystéines (voir **tableau 5**).

Ainsi, la possibilité que le mercure exerce son action sur un polypeptide liant PE33 plutôt que directement sur ce dernier demeure aussi plausible. Il est à noter que nous avons abordé la question du polypeptide touché par le mercure sous l'angle des cystéines, en admettant qu'il y ait de fortes chances que ce résidu soit touché par le mercure. La possibilité que le mercure affecte un autre résidu d'acide aminé n'est pas à négliger et dans ce cas PE33 ainsi que l'ensemble des polypeptides liant PE33 seraient aussi à considérer.

## **4.2- L'organisation structurelle et fonctionnelle du PS II**

Comme mentionné précédemment, les résultats obtenus au cours de cette étude, en plus de fournir des données nouvelles sur le mode d'action du mercure, apportent de précieuses informations nous permettant d'éclaircir certaines ambiguïtés quant à l'organisation structurelle et fonctionnelle du PS II.

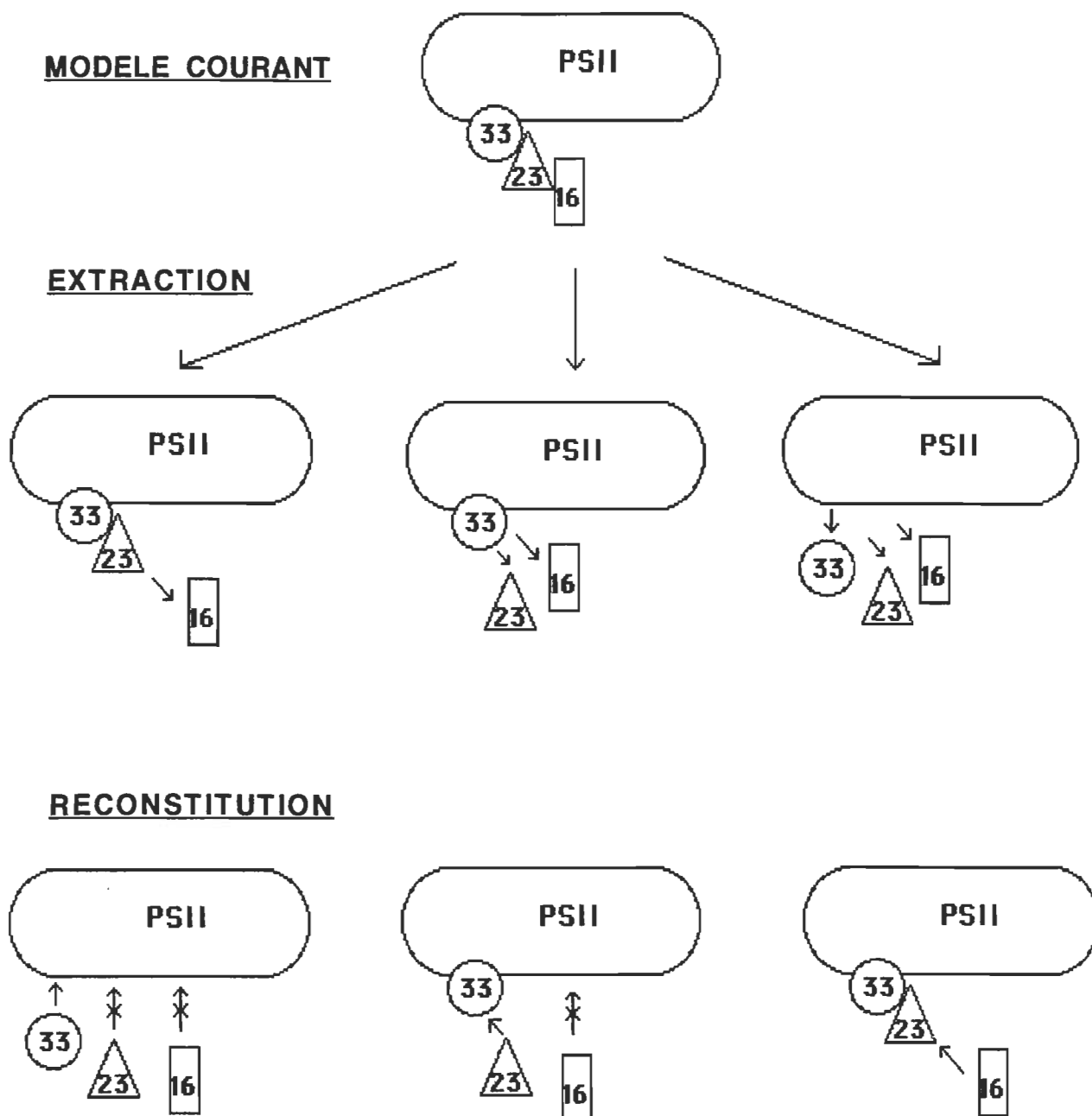
### **4.2.1- La liaison des polypeptides extrinsèques**

En étudiant l'effet du mercure sur les protéines du PS II, nous avons obtenu un résultat fort intéressant et fort surprenant. En effet, le fait que seul le polypeptide extrinsèque de 33 kDa ait été délogé suite à un traitement au mercure et que PE16 et PE23 n'aient pas été affectés constitue un résultat inattendu qui mérite de questionner la vision conventionnelle de l'organisation structurelle du PS II.

Comme mentionné précédemment, tous les traitements connus jusqu'à maintenant ayant délogé PE33 ont provoqué l'enlèvement concomitant de PE16 et PE23. Ce résultat est souvent interprété comme une indication que PE33 est localisé plus près des composantes intrinsèques de la membrane que PE16 et PE23 qui sont probablement liés à ce dernier. En fait, des expériences de reconstitution ont démontré que la présence de PE33 est essentielle pour que PE23 se lie de façon stoechiométrique et avec haute affinité avec le PS II. De même, la présence de PE33 et PE23 est essentielle pour que PE16 se lie adéquatement à la membrane (Miyao et Murata, 1983a, 1983b, 1989; Andersson et coll., 1984; Kavelaki et Ghanotakis, 1991). De plus, des études immunologiques (Oaki et coll., 1986) et des études de pontage (cross-linking) (Enami et coll., 1990) ont également suggéré que PE23 se lie à PE33. Ces résultats ont conduit au modèle courant voulant que ces trois polypeptides



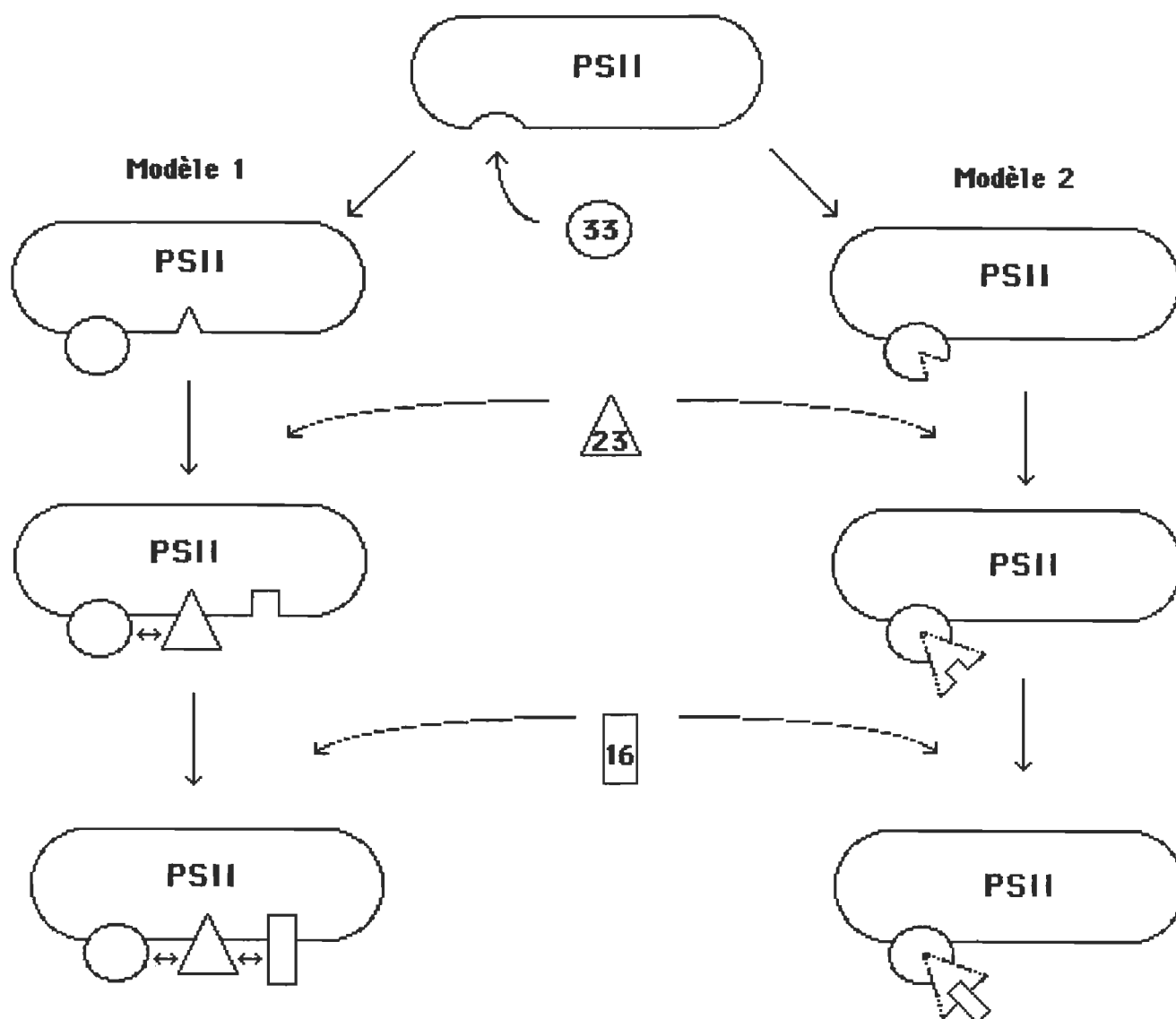
extrinsèques soient liés en séquence au PS II: PE33 étant lié à une composante intrinsèque, PE23 lié à PE33 et PE16 lié à PE23 (**Figure 37**).



**Figure 37.** Modèle courant de la liaison des polypeptides extrinsèques sur le PS II. Illustration des expériences d'extraction et de reconstitution qui ont conduit à l'élaboration de ce modèle (voir le texte pour explications).

Les résultats obtenus dans le présent travail semblent contredire ce modèle étant donné qu'il a été possible de déloger PE33 sans affecter PE16 et PE23. Nos résultats suggèrent plutôt que les polypeptides de 16 et 23 kDa ont une liaison avec le PS II indépendante de PE33. Certains résultats dans la littérature vont dans ce sens. En effet, Yamamoto (1988) a montré par des études de partition de phase que les trois protéines extrinsèques possédaient des sites de liaison sur des composantes intrinsèques du PS II. De même, Larsson et coll. (1984) sur la base d'études immunologiques, ont suggéré que PE23 se lie à des protéines intrinsèques du PS II.

Tous ces résultats ne sont peut-être pas irréconciliables. En effet, même si leurs études de reconstitution suggéraient une interaction directe entre PE16, PE23 et PE33, Miyao et Murata (1989) ont observé lors d'expériences de sédimentation que les trois polypeptides ne pouvaient se lier entre eux en solution. Ils ont alors suggéré que la liaison de PE33 à un site intrinsèque provoque un changement conformationnel qui permet la liaison subséquente de PE23 à PE33 ou à un site intrinsèque. De même, la liaison de PE23 à un site intrinsèque ou à PE33 induit un changement conformationnel permettant la liaison subséquence de PE16 à un site intrinsèque ou à PE23. La figure 38 présente de façon schématique les deux éventualités proposées par Miyao et Murata (1989). Dans le même ordre d'idée, Kavelaki et Ghanotakis (1991) ont proposé qu'une interaction directe entre PE16, PE23 et PE33 était le modèle le plus simple (modèle courant, figure 37), et qu'un modèle où PE33 en se liant à une autre composante du PS II puisse fournir les sites de liaison pour PE23 et PE16 n'était pas à exclure (modèles 1 et 2; figure 38).



**Figure 38.** Modèles de liaison des polypeptides extrinsèques du PS II (voir le texte pour explications). Les flèches indiquent la possibilité de liens entre PE33, PE23 et PE16.

À la lueur des données disponibles dans la littérature, il n'était pas possible jusqu'à maintenant de trancher pour l'un ou l'autre des modèles. Cependant, nos résultats vont clairement dans le sens du modèle 1: le fait que PE33 puisse être délogé sans que PE23 et PE16 ne soient affectés constitue une démonstration claire de l'existence d'un site de liaison intrinsèque pour PE23. Il est impossible de se prononcer ici pour PE16, il pourrait se lier soit à PE23 ou à une composante intrinsèque. Enfin, la possibilité qu'il y ait une interaction entre PE23 et PE33 n'est pas à exclure, et il est même probable que cette interaction soit essentielle pour un fonctionnement optimal du complexe de dégagement d'oxygène.

De nombreux modèles de la littérature tendent encore à illustrer PE33, PE23 et PE16 liés de façon séquentielle (Hansson et Wydrzinski, 1990; Govindjee et Coleman, 1990) . Les résultats obtenus dans le présent travail nous forcent à reconsidérer ces modèles et à opter pour des modèles schématiques où PE33 et PE23 se lient à des composantes intrinsèques (Andersson et Styring, 1991 (voir figure 4); Aro et coll., 1994; Barber, 1994), pour PE16, cela demande encore à être éclairci.

#### **4.2.2- L'interaction entre PE33 et les cofacteurs**

Comme mentionné dans l'introduction de ce présent travail, on connaît encore mal les sites de liaison des cofacteurs chlorure et calcium sur le PS II et on connaît encore mal leurs fonctions respectives dans le processus de photooxydation de l'eau. En ce qui concerne la liaison de ces cofacteurs, les études spectroscopiques tendent à démontrer qu'ils se situent à proximité du centre catalytique, près des manganèses. Il est même proposé que ces cofacteurs puissent se lier directement aux ions manganèses. De plus, les polypeptides D1, D2, CP47, CP43, PE33 et PE23 sont aussi proposés comme ligands de ces cofacteurs, mais aucune étude n'a pu déterminer clairement quel(s) polypeptide(s) est(sont) impliqué(s)

(Ghanotakis et Yocum, 1990; Debus, 1992; Vermass, 1993; Yocum, 1991). De plus, les polypeptides extrinsèques, sans nécessairement fournir de ligands pour ces cofacteurs, peuvent favoriser le maintien de l'intégrité structurale du PS II, et permettre ainsi une liaison stoechiométrique et optimale des cofacteurs à leurs sites de liaison respectifs.

C'est la première fois qu'un inhibiteur du PS II provoque la libération exclusive de PE33 sans altérer la liaison de PE23 et PE16. Un tel résultat peut nous permettre de caractériser la contribution spécifique de PE33 dans la liaison des cofacteurs, sans que le complexe ne soit destabilisé par surcroît par la perte concomitante de PE16 et PE23.

D'après nos résultats, PE33 est important pour le maintien de la liaison des chlorures, soit en fournissant un site de liaison; soit en maintenant l'intégrité structurale du complexe et faisant en sorte que le chlorure se lie adéquatement à son ou ses site(s) de liaison, soit en permettant la concentration des chlorures près du complexe de manganèse. Cette conclusion est supportée par la discussion de Coleman (1990) dans sa revue sur les sites de liaison des chlorures. Ce dernier propose que le site extrinsèque de liaison des chlorures consiste en une série de domaines situés sur PE33. Nos conclusions sont aussi supportées par les études récentes de mutation sur CP47, qui ont conduit à une destabilisation de PE33 et à un changement des besoins en chlorures chez le mutant (Putnam-Evans, 1994); ou encore, par les études de mutation sur une cystéine de PE33, qui ont conduit à une perte de PE33 et à un changement des besoins en chlorures pour le dégagement d'oxygène (Burnap et coll., 1994).

Pour ce qui est du calcium, expérimentalement, nous n'avons observé aucun effet de cet ion sur l'inhibition causée par le mercure, c'est-à-dire lorsque PE33 est délogé du PS II (voir **tableau 10**). Ce résultat présente un grand intérêt, car certains auteurs ont proposé que ce polypeptide puisse lier le calcium (Voir Yocum, 1991 pour une revue). Ces auteurs se sont

principalement basé sur une analogie de séquence entre PE33 et une protéine intestinale liant le calcium (Yocum, 1991; Coleman et Govindjee, 1987; Wales et coll., 1989), ce qui demeure une évidence bien indirecte. Si une telle liaison entre le calcium et PE33 existait, nous aurions sûrement observé un effet du calcium sur le complexe inhibé par le mercure et ainsi départi de PE33. Nos résultats permettent donc d'exclure PE33 comme candidat possible pour la liaison du calcium. Toutefois, nous devons demeurer prudent quant à cette interprétation étant donné qu'une partie seulement des PE33 a été délogée et que la proportion restante pourrait jouer un rôle dans la liaison du calcium au PS II.

#### 4.2.3 - Le rôle de PE33 dans le PSII.

En consultant la littérature, on constate rapidement que le rôle du polypeptide extrinsèque PE33, demeure encore largement énigmatique. Nombres d'expériences ont montré qu'en son absence, le processus de dégagement d'oxygène était altéré, mais était toujours possible si on ajoutait des concentrations non-physiologiques de calcium et de chlorure. Ces résultats ont conduit plusieurs auteurs à proposer un rôle régulateur ou structurel à PE33 (ainsi qu'aux autres polypeptides extrinsèques) plutôt qu'un rôle strictement catalytique dans le processus de photooxydation de l'eau (Vermass, 1993).

Si on résume l'état des connaissances actuelles sur le rôle de PE33 au PSII, il est proposé qu'il soit impliqué dans la stabilisation du complexe de manganèse, qu'il fournisse des sites de liaison pour le calcium (nos résultats permettent d'en douter), qu'il fournisse des sites de liaison aux chlorures (nos résultats vont dans ce sens), qu'il maintienne l'intégrité structurelle du PSII pour une liaison adéquate des cofacteurs sur des sites intrinsèques près du complexe de manganèse et enfin qu'il constitue (avec les autres polypeptides extrinsèques PE16 et PE23) un sorte de barrière entre le milieu aqueux du lumen et le centre catalytique

limitant ainsi l'échange des réactifs (Hansson et Wydrzinski, 1990; Vermass et coll., 1993; Andersson et Styring, 1991).

Nous nous attarderons ici à ce dernier rôle. Lorsqu'on considère le mécanisme de photooxydation de l'eau (voir section 1.2.3.1), il est largement reconnu que le complexe de dégagement d'oxygène peut se présenter sous cinq formes transitoires, les états S, désignés  $S_n$  où  $n$  correspond au nombre d'équivalent oxydant emmagasiné. La production d'oxygène survient au cours de la transition  $S_4 \rightarrow S_0$ , lorsque quatre équivalents oxydants sont emmagasinés. Au cours du processus, des protons sont aussi relargués selon la stoechiométrie 1, 0, 1, 2. (voir l'encadré de la **figure 4**). Si ces protons originent directement de l'eau ou de tout autre intermédiaire comme la matrice protéique n'a pu encore être déterminé. À quel moment l'eau se lie au site catalytique formé des quatre manganèses, demeure aussi ambigu. Certains auteurs privilégient le modèle en une étape où l'eau réagirait avec le centre catalytique uniquement lorsque les quatre équivalents oxydants sont accumulés (voir Ghanotakis et Yocum, 1990). Sur le plan thermodynamique, on opte de plus en plus pour un modèle en deux étapes (Krishtalik, 1990) où un intermédiaire, par exemple, un peroxide, pourrait être formé (Renger, 1978). Wydrzinski et coll. (1989) ainsi que Hillier et Wydrzinski (1993) ont observé une certaine production de peroxide d'hydrogène et une production abondante d'oxygène sur des PSII intacts. Cependant, ils ont observé que cette formation de peroxyde d'hydrogène s'accroît à mesure que l'intégrité du PSII est altérée par l'enlèvement des polypeptides extrinsèques, la production maximale étant atteinte lorsque PE33, PE23 et PE16 sont délogés du PSII. Leur hypothèse de travail est la suivante: un facteur déterminant de la formation de peroxyde d'hydrogène est l'accès du substrat au site catalytique. Le site catalytique du PSII est vraisemblablement localisé dans une poche hydrophobe formée en partie par les polypeptides intrinsèques D1 et D2 et en partie par les polypeptides extrinsèques. Ces auteurs croient que les polypeptides extrinsèques forment

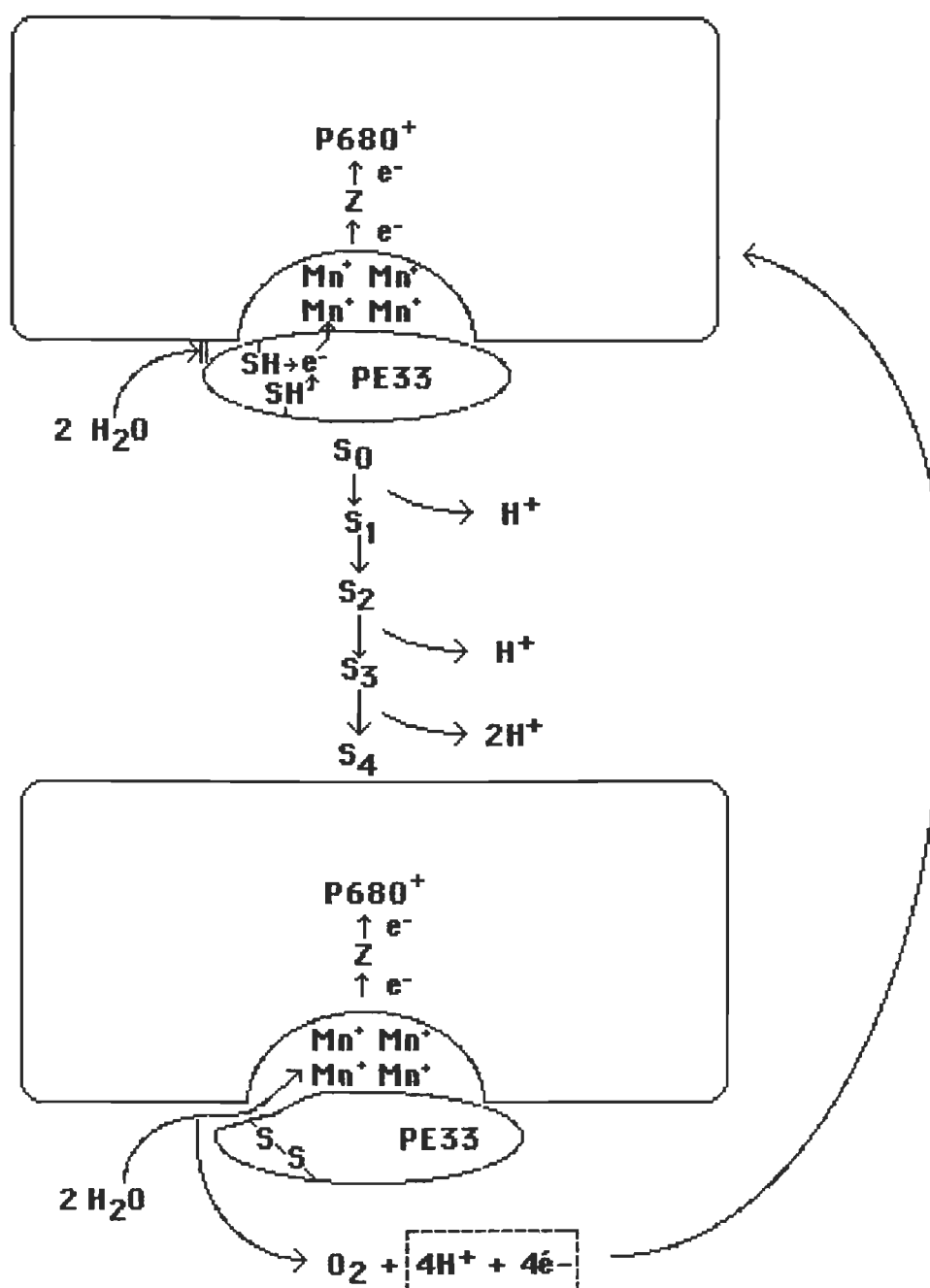
une barrière d'accessibilité entre la phase aqueuse du lumen et le site catalytique. Lorsque le PSII est intact, cette barrière régule l'entrée des molécules d'eau de sorte qu'elle se fasse au bon moment dans la séquence réactionnelle. À mesure qu'on perturbe la barrière d'accessibilité en enlevant des polypeptides extrinsèques, une entrée incontrôlée d'eau au site catalytique peut survenir et résulter en la formation de composés intermédiaires comme le peroxyde d'hydrogène à la défaveur de la production d'oxygène. Lorsqu'ils ajoutent du calcium ou des chlorures, les rendements en dégagement d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène sont inversés à la faveur de la production d'oxygène. Ces auteurs croient qu'ils rétablissent ainsi la barrière d'accessibilité en créant une aggrégation des protéines. Ils en concluent que la dynamique structurelle des protéines joue un rôle très important dans le mécanisme d'oxydation de l'eau. Ce modèle nous apparaît très intéressant. Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que l'accès de donneurs d'électrons ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ) au complexe de manganèse augmentait à mesure que les polypeptides extrinsèques sont délogés (Hansson et Wydrzinski, 1990; Rashid et Carpentier, 1990). Cependant, si la dynamique structurelle des protéines est très importante dans le processus de photooxydation de l'eau, comment PE33 et les autres polypeptides extrinsèques peuvent-ils changer de conformation au cours du processus normal de photooxydation de l'eau et faire en sorte que l'eau ait accès au centre catalytique au moment opportun? Nos résultats pourraient fournir des pistes de réponse.

Dans la section 4.1.4 du présent travail, nous nous sommes questionné sur l'identité du polypeptide affecté par le mercure. PE33 semblait un candidat de choix étant délogé par le mercure et étant un polypeptide portant deux cystéines, résidu pour lequel ce métal présente une affinité exceptionnelle. Cependant, en consultant la littérature, on constate que certains auteurs suggèrent que ces deux résidus cystéines forment un pont disulfure, ce qui les rendrait inaccessibles à une modification par le mercure. Cette ambiguïté nous a conduit à



se demander si l'état d'oxydoréduction de ces cystéines pouvait se modifier au cours du cycle des états S, c'est-à-dire suivant l'état d'oxydation des manganèses. Nous poussons un peu plus loin ici la réflexion en se demandant si une alternance entre des cystéines réduites (SH-libres) et des cystéines oxydées (pont disulfure) sur PE33, pourrait modifier sa conformation de sorte que l'accès de l'eau au site catalytique soit possible que dans une seule des deux conformations. Camm et coll. (1987) ont d'ailleurs montré que lorsqu'on brise les ponts disulfures chez PE33 cette dernière prend une forme plus allongée, une forme qui pourrait bloquer l'accès de l'eau au site catalytique. La figure 39 illustre schématiquement cette possibilité.

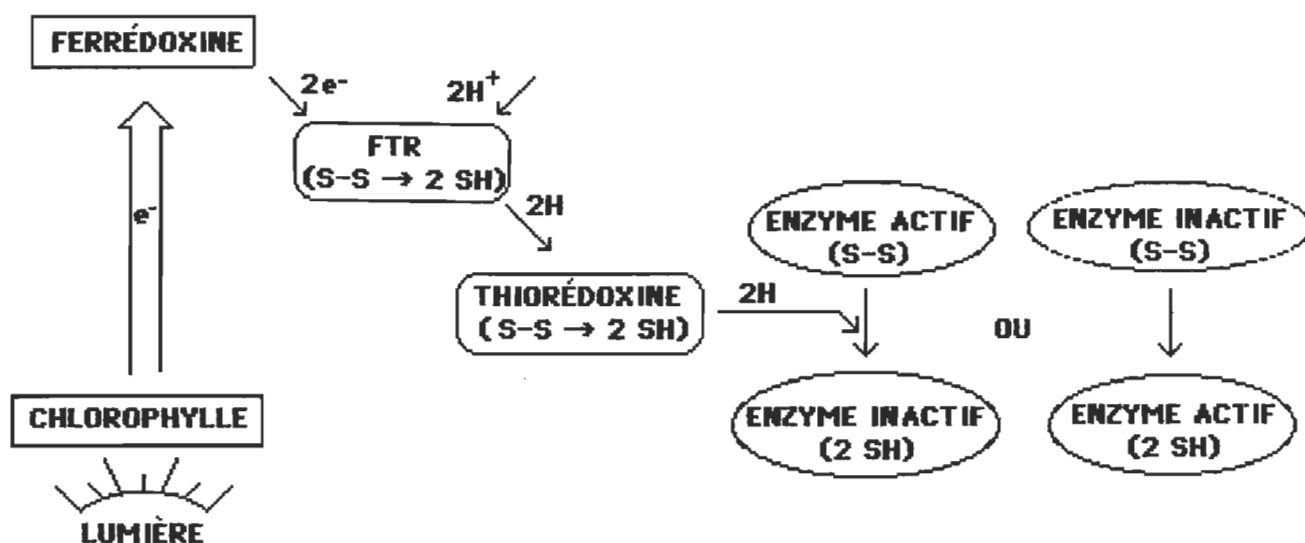
Nous proposons, qu'au cours de l'accumulation des équivalents oxydants au PSII, les cystéines de PE33 pourraient subir une oxydation, céder leur électron au complexe de manganèse (ou directement à Z), libérer deux protons et former un pont disulfure qui contracterait PE33 et fournirait un accès pour l'eau au site catalytique. On assisterait à ce moment à l'oxydation de l'eau. Deux des électrons et deux des ions  $H^+$  produits iraient réduire de nouveau le pont disulfure (le briser), de sorte que PE33 bloquerait encore l'accès au substrat et le cycle pourrait ainsi recommencer. (Les deux autres électrons et protons produits iraient restaurer les composantes les ayant fournis, les manganèses pour les électrons et des résidus d'acides aminés pour les protons probablement.). Le bilan d'un cycle serait la production d'une molécule d'oxygène et la libération dans le milieu de 4 protons selon la stoechiométrie proposée: 1, 0, 1, 2.



**Figure 39.** Modèle illustrant le rôle de PE33 comme barrière d'accessibilité dans le PSII ainsi que l'implication d'un pont disulfure (voir le texte pour explications). La notation  $Mn^+$  a été utilisée étant donné l'incertitude quant aux états d'oxydation du manganèse au cours de la progression des états S (voir la **figure 6** pour avoir un aperçu des valeurs proposées).

Le modèle présenté ici, ne tient compte que de PE33, cette protéine étant la plus étroitement associée au centre catalytique et la plus cruciale dans le processus de photooxydation de l'eau. Cependant, il est clair que les trois polypeptides extrinsèques sont étroitement reliés et un changement conformationnel sur PE33 aurait des conséquences sur l'organisation de PE23 et PE16 et sur leur rôle de barrière d'accessibilité. De plus, le modèle suggère ici que l'accès de l'eau au centre catalytique survient à l'état S<sub>4</sub>. Ceci n'est pas un parti pris, des modèles où l'eau aurait accès à des états intermédiaires (S<sub>3</sub> par exemple) sont proposés dans la littérature et notre modèle demeure plausible dans ces circonstances.

Il est clair que le modèle présenté est innovateur, fort séduisant, mais largement spéculatif. Cependant diverses données de la littérature nous permettent d'envisager une telle éventualité. En effet, la modulation de l'activité d'un enzyme par un changement dans l'état d'oxydoréduction de ses cystéines ("thio-disulfide exchange") a été démontré dans divers systèmes biologiques, tant chez les cellules végétales, animales que bactériennes (Buchanan et coll., 1994; Ziegler, 1985). La démonstration la plus convaincante nous vient justement du chloroplaste où le système Ferredoxine/Thiorédoxine module l'activité de nombreux enzymes de la phase biochimique via des changements dans le statut d'oxydoréduction de leurs cystéines (Buchanan et coll., 1991). La **figure 40**, illustre la cascade d'événements qui conduisent à la modulation par la lumière de l'activité de certains enzymes de la phase biochimique via le système Ferredoxine/thioredoxine.



**Figure 40.** Modulation par la lumière de certains enzymes du cycle de Calvin-Benson via le système Ferrédoxine/Thiorédoxine (voir le texte pour explications). (Adapté de Buchanan, 1991)

La ferrédoxine qui a reçu ses électrons en provenance de la chlorophylle via une série de transporteurs intermédiaires (voir figure 3), cèdera deux électrons à la protéine FTR (Ferredoxine Thioredoxin Reductase). Cette dernière nécessitera aussi deux protons en provenance du milieu. Une fois réduite, la protéine FTR ira réduire une protéine nommée "thiorédoxine" et provoquera le bris d'un pont disulfure. La thiorédoxine réduite ira réguler la fonction des enzymes cibles en modifiant leur statut d'oxydoréduction. Pour les enzymes biosynthétiques, la réduction de leur pont disulfure provoquera une activation et pour les enzymes impliqués dans la dégradation des hydrates de carbone, ils manifesteront une réponse opposée, c'est-à-dire une désactivation suite à une réduction. Il s'agit ici d'un exemple probant où le statut fonctionnel d'une protéine peut-être modulé par le statut d'oxydoréduction de ses groupements thiols.

Enfin, mentionnons que les thioredoxines sont des petites protéines qui sont largement répandues chez l'ensemble des organismes vivants et qui croit-on sont impliquées dans la régulation d'un grand nombre de processus dont la division cellulaire, l'action hormonale, la transcription, la méiose, la réplication de l'ADN, le développement embryonnaire, la germination, l'assemblage et la réparation des protéines (Buchanan et coll., 1994).

À la lueur de ces observations, il devient donc très plausible d'envisager qu'un mécanisme d'échange "thiol-disulfure" tel que proposé à la figure 39, puisse survenir au niveau du PS II et puisse réguler le mécanisme de photooxydation de l'eau en permettant l'accès du substrat (l'eau) au moment opportun dans la séquence réactionnelle.

De plus, un tel modèle permettrait d'éclaircir certaines incertitudes quant au processus de photooxydation de l'eau. Notons d'abord que même si on s'entend passablement dans la littérature sur la stoechiométrie de libération des protons au cours du processus de photooxydation de l'eau, leur origine demeure encore mystérieuse: Proviennent-ils directement de l'eau ou indirectement de la matrice protéique? Plusieurs auteurs suggèrent que la matrice protéique soit impliquée dans la stabilisation des charges et dans la libération des protons (Andersson et Akerlund, 1987; Debus, 1992; Mathis et Rutherford, 1994). Le présent modèle suggère l'implication de PE33 dans le relargage de protons au cours du processus de photooxydation de l'eau.

Dans le même ordre d'idée, la question des états d'oxydation des manganèses au cours du processus de photooxydatoin de l'eau est une question complexe et encore ouverte. On remarque que certains modèles proposent que l'état d'oxydation des manganèses ne varie pas lors de la transition  $S_2 \rightarrow S_3$ , autre chose serait alors oxydé et un acide aminé est proposé, en l'occurrence une histidine. De plus, la nature de  $S_4$  est encore inconnue et certains

modèles suggèrent aussi qu'un acide aminé soit impliqué (voir **figure 6**) (Rutherford, 1989; Mathis et Rutherford, 1994). Il est à noter que Mathis et Rutherford (1994) proposent l'implication d'une histidine à partir d'études effectuées sur des PSII dépourvus des polypeptides extrinsèques PE16, PE23 et PE33. Sur des PS II intacts, le scénario peut s'avérer très différents. Selon Debus (1992), sur des PSII intacts l'implication d'un résidu histidine n'a pas été démontrée hors de tout doute et l'implication d'autres acides aminés se doit d'être investiguée. Le présent modèle suggère l'implication directe ou indirecte de cystéines au cours du processus, il mérite sûrement d'être considéré.

Enfin, il a été suggéré que l'affinité du calcium pour son site de liaison variait selon la progression des états S (Boussac et Rutherford, 1988a). Cette observation permettait de réconcilier nombre de données contradictoires dans la littérature en ce qui concerne la liaison du calcium. Andersson et Styring (1991) considèrent que la possibilité que la liaison des ligands soit dépendante des états S est un concept fort valable qui devrait être considéré pour la liaison de l'eau, des chlorures et d'autres ligands. Le modèle présenté ici va exactement dans ce sens, et le changement conformationnel de PE33 proposé ici, en plus de moduler l'accès de l'eau au site catalytique, pourrait aussi moduler la liaison des cofacteurs au cours du processus de photooxydation de l'eau.

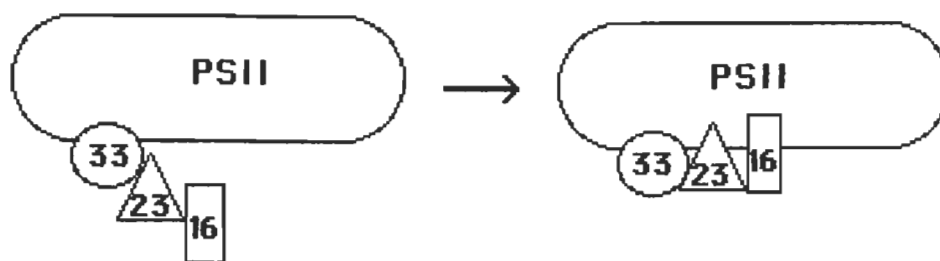
Ainsi, un tel modèle qui n'a encore jamais été proposé pourrait réconcilier nombre de données de la littérature entre autre sur l'affinité des sites de liaison de PE33, des cofacteurs, sur le relargage des protons ainsi que sur le statut des cystéines de PE33. Ce modèle quoique audacieux mérite donc sûrement d'être exploré d'avantage et d'être mis à l'épreuve, tant sur le plan biochimique que sur le plan thermodynamique.

## CHAPITRE 5

### CONCLUSION

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse ont permis de jeter une lumière nouvelle tant sur certains aspects structurels et fonctionnels du photosystème II que sur le mode d'inhibition d'un polluant majeur le mercure.

L'enlèvement exclusif de PE33 (sans l'enlèvement concomitant de PE16 et PE23) en présence de mercure constitue le résultat le plus étonnant et le plus révélateur du présent travail. C'est la première fois qu'une telle altération du complexe protéique survient, ce qui nous a amené à éclaircir une ambiguïté quant à l'organisation structurelle du PS II. En effet, la vision conventionnelle et répandue voulant que PE33, PE23 et PE16 se lient en séquence sur la membrane du PS II n'est plus valide. Le fait qu'on ait pu déloger PE33 de la membrane sans déloger PE23 et PE16 nous indique clairement que ces deux polypeptides peuvent se lier au PS II à des sites autres que sur PE33. La **figure 41** illustre schématiquement le changement de conception apporté par nos résultats quant à la liaison des polypeptides extrinsèques (pour plus de détails voir la section 4.2.1).



**Figure 41.** La liaison des polypeptiques extrinsèques du PS II. Le schéma de gauche illustre le modèle conventionnel, celui de droite, un nouveau modèle tenant compte de nos résultats et des données disponibles dans la littérature.

Une autre information nouvelle sur l'organisation structurale du PS II concerne l'interaction entre PE33 et le calcium et le chlorure. Le ou les site(s) de liaison de ces cofacteurs sont encore inconnus, mais PE33 fait partie des polypeptides candidats à la liaison de ces cofacteurs. Dans le cadre de notre étude, seul l'équilibre des chlorures a été perturbé lorsque PE33 était délogé de la membrane; l'ajout de calcium n'a en rien modifié l'inhibition observée. Nos résultats indiquent donc qu'il est peu probable que PE33 lie le calcium, et qu'il est fort probable que PE33 soit impliqué directement ou indirectement dans la liaison des chlorures.

En plus d'apporter des précisions sur l'interaction entre les polypeptides extrinsèques du PS II de même que sur leurs fonctions respectives, ce résultat ouvre la porte à de nombreuses études ultérieures. En effet, c'est la première fois qu'un inhibiteur du PS II provoque la libération exclusive de PE33 sans altérer la liaison de PE23 et PE16. Un tel résultat peut nous permettre de caractériser la contribution spécifique de PE33 dans la fonction du PS II, sans que le complexe ne soit déstabilisé par surcroît par la perte concomitante de PE16 et PE23, comme ce fut le cas pour un grand nombre d'études antérieures. En effet, l'approche où l'on enlève successivement, PE16, PE23 et ensuite



PE33 pour caractériser leurs fonctions respectives a été largement utilisée. Mais lorsque PE33 était extrait, le complexe était déjà déstabilisé par l'absence de PE16 et PE23. Ces résultats sont donc à considérer avec prudence. Le PS II modifié par le mercure peut donc constituer un modèle de choix pour des études de caractérisation de la fonction de PE33. On sait que ce polypeptide se situe près du centre catalytique du PS II, on croit qu'il est très important pour la stabilisation du complexe de manganèse, mais il reste beaucoup encore à élucider quant à son interaction avec les polypeptides environnants, avec les cofacteurs du PS II ainsi qu'à son implication dans le processus de photooxydation de l'eau (Debus, 1992). Un grand nombre de méthodes biophysiques raffinées sont maintenant à notre portée pour étudier les détails moléculaires du fonctionnement du PS II (EPR, EXFAS etc...). Nul doute qu'il sera très intéressant d'observer la progression des états S, l'état d'oxydation des manganèses, de la tyr Z, de P680, de la phéophytine, de Qa et de Qb, lorsqu'uniquement PE33 sera délogé du PS II. Ainsi, nous croyons que le présent travail ouvre une porte à de nombreuses études ultérieures.

Dans le même ordre d'idée, nous avons proposé un modèle relativement innovateur quant à la fonction de PE33 sur le PSII. En effet, nous avons proposé que ce dernier puisse servir de barrière d'accessibilité limitant l'accès des substrats au centre catalytique du PSII. D'autres équipes avaient proposé une telle éventualité (Wydrzynski et coll., 1989; Hillier et Wydrzynski, 1993), cependant, aucune n'avait suggéré comment PE33 pouvait alternativement permettre ou bloquer l'accès de l'eau au site catalytique pour faire en sorte qu'elle interagisse avec les manganèses au moment opportun de la séquence réactionnelle. Nous proposons ici une alternance entre l'état réduit et oxydé des cystéines de PE33, cette alternance entre la formation et le bris d'un pont disulfure, provoquerait un changement conformationnel chez la protéine entre une forme plus allongée et une forme plus contractée qui permettrait l'accès de l'eau au site catalytique du PSII. Nul doute que ce modèle mérite

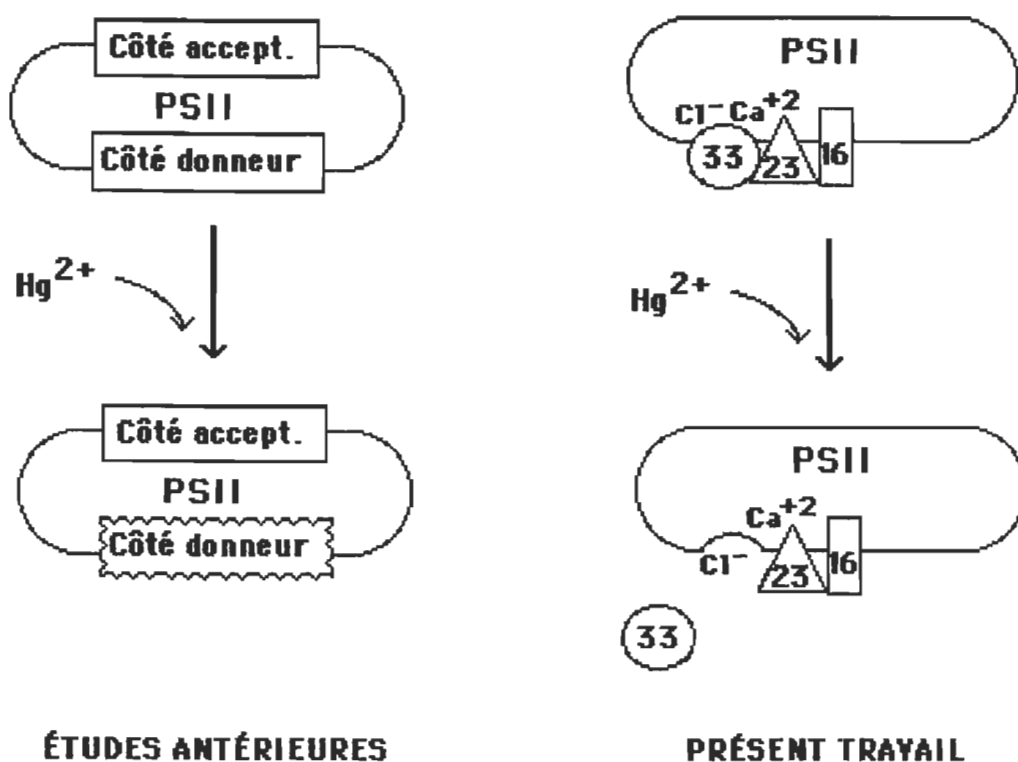
d'être considéré et pourrait s'ouvrir sur un grand nombre d'expériences destinées à l'éprouver.

De plus, les travaux accomplis dans le cadre de cette thèse ont apporté une nouvelle compréhension du mode d'action du mercure sur le PS II, et dans un sens plus large du mode d'action du mercure sur les protéines membranaires.

La figure 42, illustre très schématiquement l'apport de ce travail pour la progression des connaissances sur le mode d'action du mercure sur le côté donneur du PS II. Le PS II est d'abord illustré avec son côté donneur et son côté accepteur, certaines études antérieures avaient proposé que le mercure exerce son action (en tout ou en partie) sur le côté donneur du PS II (voir tableau 4 pour plus de détails). Cependant aucune information n'était disponible en ce qui concerne les composantes du PS II pouvant être affectées. Grâce au présent travail, on sait maintenant que la liaison de PE33 sur le PS II est affectée et on sait maintenant que l'équilibre des ions chlorures est perturbé.

Cependant, certaines questions cruciales sont restées en suspens et méritent sûrement d'être approfondies. Reste à préciser si le mercure provoque ces perturbations en agissant directement sur PE33 ou sur un polypeptide impliqué dans la liaison de PE33 et des chlorures. De plus, reste à préciser si une ou des cystéines du ou des polypeptides affectés sont touchées où s'il s'agit d'un autre résidu d'acide aminé. Chose certaine, l'absence de données sur les résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison des cofacteurs, dans la liaison des polypeptides, dans le fonctionnement du PS II a été maintes fois soulignée par nombre d'auteurs (Debus, 1992; Yocum, 1991; Coleman, 1991; Ghanotakis et Yocum, 1990; Vermass, 1990; Hansson et Wydrzinski, 1990). Les études de mutation dirigées foisonnent de plus en plus dans la littérature. Mais comme mentionne Vermass (1994) pour

qu'une étude de mutation dirigée soit employée efficacement, on doit avoir une bonne idée des résidus importants à viser. Le présent travail montre clairement que les cystéines du PS II devraient être des cibles à privilégier dans l'avenir. Plus spécifiquement, la cystéine 198 de CP47 présente selon notre analyse un très grand intérêt (voir section 4.1.4).



**Figure 42.** Effet du mercure sur le PS II. Les études antérieures avaient démontré que le mercure exerce son action (en tout ou en partie) sur le côté donneur du PS II. Le présent travail apporte des précisions supplémentaires sur les composantes du PS II étant affectées.

Ainsi, par l'ensemble de ce travail nous croyons avoir contribué à l'avancement des connaissances sur ce fascinant complexe multiprotéique qu'est le PS II. Nos travaux s'inscrivent dans une vaste opération destinée à élucider un des phénomènes les plus fondamental en biologie. Bien que notre contribution soit modeste, le phénomène lui, ne l'est pas. Quel étonnement d'apprendre que le processus de photooxydation de l'eau survenant au PS II conduit à la production de 10 000 tonnes d'oxygène par seconde à l'échelle de la planète. Nul doute qu'un certain nombre d'entre elles sont consommées par l'ensemble des chercheurs tentant d'élucider le phénomène! Ce fut une expérience des plus enrichissantes que de participer à cet inextricable cycle de vie, mais combien menacé? Les organismes photosynthétiques sont agressés de toutes parts par nos sociétés industrialisées. Une meilleure compréhension du mode d'action de ces agresseurs constitue une voie importante pour tenter d'estimer et de limiter l'agression, mais il ne faut pas oublier, je crois, que les efforts fondamentaux à déployer se situent à la source, avant le déversement de ces agresseurs dans l'environnement.

## CHAPITRE 6

### BIBLIOGRAPHIE

- Albertsson, P.E. (1987) The domain organization of the chloroplast photosynthetic membrane. Chemica Scripta, **27B**, 189-194.
- Albertsson, P.E., Andreasson, E., Stefansson, H. et Wollenberger, L. (1994) Fractionation of thylakoid membrane. Meth. in Enzymol., **228**, 469-482.
- Allen, J.F. (1992) How does protein phosphorylation regulate photosynthesis? TIBS, **17**, 12-17.
- Amesz, J. (1983) The role of manganese in photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta, **726**, 1-12.
- Anderson, J.M. (1981) Consequences of spatial separation of photosystem 1 and 2 in thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. FEBS Lett., **124(1)**, 1-10.
- Anderson, J.M. et Andersson, B. (1982) The architecture of photosynthetic membranes: lateral and transverse organization. TIBS, **aug.**, 288-292.
- Anderson J.M. et Andersson, B. (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. TIBS, **sept.**, 351-355.

- Andersson, B. (1986) Proteins participating in photosynthetic water oxydation. In L.A. Staehelin et C.J. Arntzen (Eds): Encyclopedia of Plant Physiology (vol. 19). Springer Verlag: Berlin, pp. 447-456.
- Andersson, B. et Åkerlund, H.E. (1978) Inside-out membrane vesicles isolated from spinach thylakoid. Biochim. Biophys. Acta, **503**, 462-472.
- Andersson, B. et Åkerlund, H.E. (1987) Proteins of the oxygen evolving complex. In J. Barber (Ed.): Topics in Photosynthesis (vol 8) - The Light Reactions. Elsevier: Amsterdam, pp 370-420.
- Andersson, B., Critchley, C., Ryrie, I.J., Jansson, C., Larsson, C. et Anderson, J.M. (1984) Modification of the chloride requirement for photosynthetic O<sub>2</sub> evolution. The role of the 23 kDa polypeptide. FEBS Lett., **168**, 113-119.
- Andersson, B., Larsson, C., Jansson, C., Ljungberg, U. et Åkerlund, H.E. (1984) Immunological studies on the organization of proteins in photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta., **766**, 21-28
- Andersson, B. et Styring, S. (1991) Photosystem II: Molecular organization, function and acclimation. In C.P. Lee (Ed.): Current Topics in Bioenergetics (vol. 16). Academic Press: San Diego, pp. 1-81.
- Andreasson, E., Svensson, P., Weisbull, C. et Albertsson, P.A. (1988) Separation and characterization of stroma and grana membranes - evidence for heterogeneity in antenna size of both photosystem I and photosystem II. Biochim. Biophys. Acta, **936**, 339-350.

- Anner, B.M. et Moosmayer, M. (1992a) Mercury inhibits Na-K-ATPase primarily at the cytoplasmic side. Am. J. Physiol., **262**, F843-F848.
- Anner, B.M., Moosmayer, M. et Imesch, E. (1992b) Mercury blocks Na-K-ATPase by a ligand-dependent and reversible mechanism. Am. J. Physiol., **262**, F843-F848.
- Aoki, K., Ideguchi, T., Kakuno, T., Yamashita, J. et Takekazu, H. (1986) Intermolecular relations of the photosystem II complex in spinach chloroplasts as detected by immunochemical assay. J. Biochem., **100**, 875-882.
- Aro, E.M., Virgin, I. et Andersson, B. (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Biochim. Biophys. Acta, **1143**, 113-134.
- Babcock, G.T. (1987) The photosynthetic oxygen evolving process. In Ames J. (Ed.): New Comprehensive Biochemistry (vol. 15) - Photosynthesis. Elsevier: Amsterdam, pp. 125-158.
- Barber, J. (1994) Photoxynthetic oxygen evolution - Photosystem II. No longer the black box of photosynthesis. Biochem.Soc. Trans., **22**, 313-318.
- Bassi, R., Hoyer-Hansen, G., Barbato, R., Giacometti, G.M. et Simpson, D.J. (1987) Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system. J. Biol. Chem., **262**, 13333-13341.
- Bassi, R., Rigoni, F. et Giacometti, G.M. (1990) Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. Photochem. Photobiol., **52** (6), 1187-1206.
- Beauregard, M., Morin, L. et Popovic, R. (1987) Sulfate inhibition of the oxygen evolving complex of photosystem II. Appl. Biochem. Biotechnol., **16**, 109-117.

- Béliveau, R., Bernier, M., Giroux, S. et Bates, D. (1988) Inhibition by phenylglyoxal of the sodium-coupled fluxes of glucose and phosphate in renal brush-border membranes. Biochem. Cell Biol., **66**(9), 1005-1012.
- Benoît, C. et Lucotte, M. (1994) Enquête sur le mercure du Moyen-Nord québécois. Interface, **15**(2), 26-35.
- Bernier, M., Popovic, R. et Carpentier, R. (1993) Mercury inhibition at the donor side of photosystem II is reversed by chloride. FEBS Lett., **321**, 19-23.
- Bernier, M. et Carpentier, R. (1995) The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II. FEBS Lett., **360**, 251-254.
- Berthold, D.A., Babcock, G.T. et Yocum, C.A. (1981) A highly resolved oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. FEBS Lett., **134**, 231-234.
- Boardman, N.D. et Anderson, J.M. (1964) Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different proportions of chlorophyll *b* and their possible role in the light reaction of photosynthesis. Nature, **203**, 166-167.
- Bogorad, L. (1991) An introduction to photosynthesis and the photosynthetic apparatus. In L. Bogorad et I.K. Vasil (Eds): The photosynthetic apparatus: Molecular biology and operation. Academic Press: San Diego, pp. 3-23.
- Bohnert, H.J. et Jensen, R.G. (1991) Biochemical and molecular studies of photosynthesis. Current Opinion in Biotechnology, **2**, 171-177.



- Boussac, A., Maison-Peteri, B., Etienne, A.L. et Vernotte, C. (1985) Reactivation of oxygen evolution of NaCl-washed photosystem-II particles by  $\text{Ca}^{2+}$  and/or the 24 kDa protein. Biochim. Biophys. Acta, **808**, 231-234.
- Boussac, A. et Rutherford, A.W. (1988a)  $\text{Ca}^{2+}$  binding to the oxygen evolving enzyme varies with the redox state of the Mn cluster. FEBS Lett., **236**, 432-436.
- Boussac, A. et Rutherford, A.W. (1988b) The nature of the inhibition of the oxygen evolving enzyme of photosystem II which is induced by NaCl washing and reversed by the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Sr}^{2+}$ . Biochemistry, **27**, 3476-3483.
- Boussac, A. et Rutherford, A.W. (1994a) The oxygen evolving enzyme: Effects of calcium and chloride ions. Biochem. Soc. Trans., **22**, 352-358.
- Boussac, A. et Rutherford, A.W. (1994b) Electron transfer in chloride-depleted photosystem II. J. Biol. Chem., **269** (17), 12462-12467.
- Bove, J.M., Bove, C., Whatley, F.R. et Arnon, D.I (1963) Chloride requirement for oxygen evolution in photosynthesis. Z. Naturforsch., **18b**, 683-688.
- Bowlby, N.R. et Frasch, W.D. (1986) Isolation of a manganese-containing protein complex from photosystem II preparations of spinach. Biochemistry, **25**, 1402-1407.
- Briantais, J.M., Vernotte, C., Krause, G.H. et Weis, E. (1986) Chlorophyll *a* fluorescence of higher plants, chloroplasts and leaves. In Govindjee, J. Ames et D.C. Fork (Eds): Light Emission by Plants and Bacteria. Academic Press: Orlando.
- Bricker, T.M. (1990) The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in Photosystem II. Photosynth. Res., **24**, 1-13.

- Bricker, T., Odom, W et Queirolo, C. (1988) Close association of the 33 kDa extrinsic protein with the apoprotein of CPa-1 in Photosystem II. FEBS Lett., **231**, 111-117.
- Brudvig, G.W., Thorp, H.H. et Crabtree, R.H. (1991) Probing the mechanism of water oxidation in photosystem II. Acc. Chem. Res., **24**, 311-316.
- Buchanan, B. (1991) Regulation of CO<sub>2</sub> assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Ach. Biochem. Biophys., **288**(1), 1-9.
- Buchanan, B., Schürmann, P., Decottignies, P. et Lozano, R.M. (1994) Thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine. Ach. Biochem. Biophys., **314**(2), 257-260.
- Burnap, R.L., Qian, M., Shen, J.R., Yorinao, I. et Sherman, L.A. (1994) Role of disulfide linkage and putative intermolecular binding residues in the stability and binding of the extrinsic manganese-stabilizing protein to the photosystem II reaction center. Biochemistry, **33**, 13712-13718.
- Büsselberg, D., Evans, M.L., Rahmann, H. et Carpenter, D.O. (1991) Effects of inorganic and triethyl lead and inorganic mercury on the voltage activated calcium channel of *Aplysia* Neurons. Neurotoxicology, **12**, 733-744.
- Camm, E.L., Green, B.R., Allred, D.R. et Staehelin, A. (1987) Association of the 33 kDa extrinsic polypeptide (water-splitting) with PSII particles: immunochemical quantification of residual polypeptide after membrane extraction. Photosynth. Res., **13**, 69-80.

- Cammarata, K. et Cheniae, G. (1987) Studies on 17, 24 kD depleted photosystem II membranes. I. Evidence for high and low affinity calcium sites in 17, 24 kD depleted PSII membranes from wheat versus spinach. Plant Physiol., **84**, 8577-8595.
- Campbell, G.S., Yu, J.H. et Oxender, D.L. (1992) Chemical modification of the neutral amino acid transport system L of chinese hamster ovary cells with p-chloromercuribenzenesulfonate. J. Biol. Chem., **257** (18), 12496-12500.
- Campbell, N.A. et Mathieu, R. (1995) Biologie. Saint-Laurent: Ed. du Renouveau Pédagogique.
- Cheniae, G.M. et Martin, I.F. (1971) Effects of hydroxylamine on photosystem II. I. Factors affecting the decay of O<sub>2</sub> evolution. Plant Physiol., **47**, 568-575.
- Chiaudani, G. et Vighi, M. (1978) The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. Mitt. Internat. Verein. Limnol., **21**, 316-329.
- Clijsters, H. et van Assche, F. (1985) Inhibition of photosynthesis by heavy metals. Photosynth. Res., **7**, 31-40.
- Coleman, W.J. (1990) Chloride binding proteins: mechanistic implications for the oxygen-evolving complex of Photosystem II. Photosynth. Res., **23**, 1-27.
- Coleman, W.J. et Govindjee (1987) A model for the mechanism of chloride activation of oxygen evolution in photosystem II. Photosynth. Res., **13**, 199-223.
- Critchley, C. (1985) The role of chloride in photosystem II. Biochim. Biophys. Acta, **811**, 33-46.

- Critchley, C. et Sargeson, A.M. (1984) A manganese-chloride cluster as the functional centre of the O<sub>2</sub> evolving enzyme in photosynthetic systems. FEBS Lett., **177**, 2-5.
- Damoder, R., Klimov, V.V. et Dismukes, G.C. (1986) The effect of Cl<sup>-</sup> depletion and X<sup>-</sup> reconstitution on the oxygen-evolution rate, the yield of the multiline manganese EPR signal and EPR signal II in the isolated photosystem II complex. Biochim. Biophys. Acta, **848**, 378-391.
- de Fillipis, L.F., Rüdiger, H. et Ziegler, H. (1981) The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena* . Arch. Microbiol., **128**, 407-411.
- Debus, R.J. (1992) The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta, **1102**, 269-352.
- Debus, R.J., Barry, B.A., Babcock, G.T. et McIntosh, L. (1988) Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **85**, 427-430.
- Debus, R.J., Barry, B.A., Sithole, I., Babcock, G.T. et McIntosh, L. (1988) Directed mutagenesis indicates that the donor to P680<sup>+</sup> in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. Biochemistry, **27**, 9071-9074.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. et Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodopseudomonas viridis* at 3Å resolution. Nature, **318**, 618-624.
- Deisenhofer, J. et Michel, H. (1989) Nobel lecture: the photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis* . EMBO J., **8**, 2149-2169.

- Delieu, T. and Walker, D.A. (1972) An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. New Phytol., **71**, 201.
- Delieu, T. et Walker, D.A. (1972) An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. New Phytol., **71**, 201-225.
- Delnomdedieu, M., Boudou, A., Desmazès, J.-P. et Georgescauld, D. (1989) Interaction of mercury chloride with the primary amine group of model membranes containing phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine. Biochim. Biophys. Acta, **986**, 191-199.
- Delnomdedieu, M., Boudou, A., Georgescauld, D. et Dufourc, E.J. (1992) Specific interactions of mercury chloride with membranes and other ligands as revealed by mercury-NMR. Chem.-Biol. Interactions, **81**, 243-269.
- Diner, B.A., Nixon, P.J. et Farchaus, J.W. (1991) Site-directed mutagenesis of photosynthetic reaction centers. Curr. Opin. Struct. Biol., **1**, 546-554.
- Dunahay, T.G., Staehelin, L.A., Seibert, M., Ogilvie, P.D. et Berg, S.P. (1984) Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen-evolving photosystem II preparations from spinach. Biochim. Biophys. Acta, **764**, 179-193.
- Duysens, L.N.M. et Sweers, H.E. (1963) Mechanisms of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. Japan Society of Plant Physiology, Univ of Tokyo Press: Tokyo, pp 353-372.

- Eaton-Rye, J.J. et Murata, N. (1989) Evidence that the amino-terminus of the 33 kDa extrinsic protein is required for binding to the Photosystem II complex. Biochim. Biophys. Acta, **977**, 219-226.
- Enami, I., Miyaoka, T., Mochizuki, Y., Shen, J.R., Satoh, K. et Katoh S. (1989) Nearest neighbor relationships among constituent proteins of oxygen-evolving Photosystem I membranes: binding and function of the extrinsic 33 kDa protein. Biochim. Biophys. Acta, **973**, 35-40.
- Enami, I., Mochizuki, Y., Takahashi, S., Kakuno, T., Horio, T., Satoh, K. et Katoh, S. (1990) Evidence from crosslinking for nearest-neighbor relationships among the three extrinsic proteins of spinach photosystem II complexes that are associated with oxygen evolution. Plant Cell Physiol., **31** (5), 725-729.
- Enami, I., Kaneko, M., Kitamura, N., Koike, H., Sonoike, K., Inoue, Y. et Katoh, S. (1991) Total immobilization of the extrinsic 33 kDa protein in spinach photosystem II membrane preparations. Protein stoichiometry and stabilization of oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta, **1060**, 224-232.
- Enami, I., Satoh, K. et Katoh, S. (1987) Crosslinking between the 33 kDa extrinsic protein and the 47 kDa chlorophyll-carrying protein of the PSII reaction center core complex. FEBS Lett., **226**(1), 161-165.
- Erickson, J.M. et Rochaix, J.D. (1992) The molecular biology of photosystem II. In J. Barber (Ed.): Topics in photosynthesis (vol. 11). Elsevier: Amsterdam, pp. 101-177.
- Etienne, A.L. et Kirilovsky, D. (1993) The primary structure of D1 near Qb pocket influences oxygen evolution. Photosynth. Res., **38**, 387-394.

- Falchuk, K.H., Goldwater, L.J. et Vallee, B.L. (1977) The biochemistry and toxicology of mercury. In C.A. McAuliffe (Ed.) : The Chemistry of Mercury (part 4). MacMillan: London, Toronto, pp. 259-283.
- Falkowski, P.G., Fujita, Y., Ley, A. et Mauzerall, D. (1986) Evidence for cyclic electron flow around photosystem II in *Chlorella pyrenoidosa* . Plant Physiol., **81**, 310-312.
- Finkle, B.J., Zavala, M.E. et Ulrich, J.M. (1985) Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. In K.K. Kartha (Ed.): Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press: Boca Raton, pp. 75-114.
- Förster V. et Junge, W. (1985) Stoichiometry and kinetics of proton release upon photosynthetic water oxidation. Photochem. Photobiophys., **41**, 183-190.
- Foy, C.D.K, Chaney, R.L. et White, M.C. (1978) Ann. Rev. Plant Physiol., **29**, 511-566.
- Fragata, M., Menikh, A. et Nénonéné, E.K. (1994) Functional and structural aspects of thylakoid lipids in oxygen evolution in photosystem II. Trends in Photochem. Photobiol., **3**, 201-210.
- Frankel, L.K. et Bricker, T.M. (1992) Interaction of CPa-1 with the manganese-stabilizing protein of Photosystem II: Identification of domains on CPa-1 which are shielded from N-hydroxysuccinimide biotinylation by the manganese-stabilizing protein. Biochemistry, **31**, 11059-11064.
- Funk, C., Schroeder, W.P., Green, B.R., Renger, G. et Andersson, B. (1994) The intrinsic 22 kDa protein is a chlorophyll-binding subunit of photosystem II. FEBS Lett., **342**, 261-266.

- Ghanotakis, D.F. et coll. (1987) Comparative structural and catalytic properties of oxygen evolving photosystem II preparations. Photosynth. Res., **14**, 191-199.
- Ghanotakis, D.F. et Yocum, C.F. (1990) Photosystem II and the oxygen-evolving complex. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **41**, 255-276.
- Ghanotakis, D.F. et Yocum, C.Y. (1985) Polypeptides of photosystem II and their role in oxygen evolution. Photosynth. Res., **7**, 97-114
- Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T. et Yocum, C.F. (1984a) Calcium reconstitutes high levels of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem II preparations. FEBS Lett., **167**, 127-130.
- Ghanotakis, D.F., Topper, H.N., Babcock, G.T. et Yocum, C.F. (1984b) Water-soluble 17 and 23 kDa polypeptides restore oxygen evolution activity by creating a high-affinity binding site for  $\text{Ca}^{2+}$  on the oxidizing side of Photosystem II. FEBS Lett., **170**, 169-173.
- Gingras, Y. (1994) Rapport de stage. Université du Québec à Trois-Rivières.
- Gingras, Y., Harnois, J., Ross, G. et Carpentier, R. (1995) Inhibition of oxygen evolution in chloroplast photosystem II by the protein-modifying agent tetranitromethane. Photochem. Photobiology, **61**(2), 183-189.
- Govindjee et Satoh, K. (1986) Fluorescence properties of chlorophyll *b*- and chlorophyll *c*-containing algae. In Govindjee, J. Ames et D. Fork (Eds): Light Emission by Plants and Bacteria. Academic Press: Orlando, pp. 499-537.
- Govindjee et Coleman, W. (1990) La production d'oxygène par les plantes. Pour la Science, **150**, 42-49.



- Gray, J.C., Hird, S.M., Wales, R., Webber, A.N. et Willey, D.L. (1989) Genes and polypeptides of photosystem II. In J. Barber et R. Malkin (Eds): Techniques and new developpements in photosynthesis research. Plenum: New York, pp. 423-435.
- Green, B.R. (1988) The chlorophyll protein complexes of higher plant photosynthetic membranes or just what green band is that? Photosynth. Res., **15**, 3-32.
- Gregory, R.P.F. (1989) Biochemistry of photosynthesis. Wiley & Sons: Chichester.
- Hader, D.P. et Tevini, M. (1987) General Photobiology. Pergamon Press: Oxford.
- Haehnel, W. (1986) Plastocyanin. In A. Pirson et M.H. Zimmerman (Eds): Photosynthesis III - Photosynthetic Membranes and Light Systems. Springer Verlag: Berlin, pp. 547-559.
- Hames, B.D. et Rickwood, D. (1981) Gel electrophoresis - A practical approach. Oxford: IRL Press.
- Hansson, Ö. et Wydrzynski, T. (1990) Current perceptions of Photosystem II. Photosynth. Res., **23**, 131-162.
- Hedge, U., Padhye, S., Kovács, L., Vozár, A. et Demeter, S. (1995) Modification of histidine residues of photosystem II by diethyl pyrocarbonate inhibits the electron transfer between the primary (Q<sub>A</sub>) and secondary donor (Q<sub>B</sub>) quinone acceptor. Z. Naturforsch., **480**, 896-902.
- Hermann, R.G., Alt, J., Schiller, B., Widger, W.R. et Cramer, W.A. (1984) Nucleotide sequence of the gene for apocytochrome *b*-559 on the spinach plastid chromosome: implications for the structure of the membrane protein. FEBS Lett., **176**, 239-244.

- Hewitt, E.G. (1959) In W. Rhuland (Ed.): Encyclopedia of Plant Physiology (vol. 4). Springer Verlag: Berlin, pp. 427-461.
- Hillier, W. et Wydrzynski, T. (1993) Increases in peroxide formation by the Photosystem II oxygen evolving reactions upon removal of the extrinsic 16, 22 and 33 kDa proteins are reversed by chloride. Photosynth. Res., 38, 417-423.
- Hobe, S., Förster, R., Klingler, J. et Paulsen, J. (1995) N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll a/b binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll a/b complex. Biochemistry, 34, 1995.
- Homann, P.H. (1985) The association of functional anions with the oxygen-evolving center of chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 809, 311-319.
- Homann, P.H. (1987) The relations between the chloride, calcium and polypeptide requirements of photosynthetic water oxidation. J. Bioenerg. Biomemb., 19, 105-123.
- Homann, P.H. (1988a) Chloride relations of photosystem II membrane preparations depleted of, and reconstituted with, their 17 and 23 kDa extrinsic polypeptides. Photosynth. Res., 15, 205-220.
- Homann, P.H. (1988b) Structural effects of chloride and other anions on the water-oxidizing complex of chloroplast photosystem II. Plant Physiol., 88, 194-199.
- Homann, P.H. (1988c) Explorations in the "inner sanctum of the photosynthetic process", the water oxidizing system. Plant Physiol., 88, 1-5.
- Homann, P.H. (1988d) The chloride and calcium requirement of photosynthetic water oxidation: effects of pH. Biochim. Biophys. Acta, 934, 1-15.

- Honeycutt, R.C. and Krogmann, D.W. (1972) Inhibition of chloroplast reactions with phenylmercuric acetate. Plant Physiol., **49**, 376-380.
- Hoober, J.K. (1984) Chloroplasts. Plenum: New York.
- Hsu, B.D. et Lee, J.Y. (1988) Toxic effects of copper on photosystem II of spinach chloroplasts. Plant Physiol., **87**, 107-115.
- Ikeuchi, M. et Inoue, Y. (1986) Characterization of O<sub>2</sub> evolution by a wheat photosystem II reaction center complex isolated by a simplified method. Disjunction of secondary acceptor quinone and enhanced Ca<sup>2+</sup> demand. Arch. Biochem. Biophys., **247**, 97-107.
- Ikeuchi, M. et Inoue, Y. (1988) A new photosystem II reaction center component (4.8 kDa) encoded by chloroplast genome. FEBS Lett., **241**, 99-104.
- Imesh, E., Moosmayer, M. et Anner, B.M. (1992) Mercury weakens membrane anchoring of Na-K-ATPase. Am. J. of Physiol., **262**, F837-F842.
- Irrgang, K.D., Geiken, B., Lange, B. et Renger, G. (1992) Disulfide bridge modifiers and sulfhydryl group blockers are inactivating the oxygen evolving enzyme of PSII from spinach. In N. Murata (Ed.): Research in photosynthesis (vol. 2). Kluwer: Dordrecht, pp. 417-420.
- Isogai, Y., Yamamoto, Y. et Nishimura, M. (1985) Association of the 33-kDa polypeptide with the 43-kDa component in photosystem II particles. FEBS Lett., **187**(2), 240-244.
- Itoh, S. et Uwano, S. (1986) Characteristics of the chloride action site in the oxygen-evolving reaction in photosystem II particles: Electrostatic interactions with ions. Plant Cell Physiol., **27**, 25-36.

- Ivey, S. et Berg, S.P. (1985) The use of polyclonal antibodies to identify peptides exposed on the stroma side of the spinach thylakoid. Photosynth. Res., **6**, 193-199.
- Izawa, S., Heath, R.L. et Hind, G. (1969) The role of chloride ion in photosynthesis. III. The effect of artificial electron donors upon electron transport. Biochim. Biophys. Acta, **180**, 388-398.
- Jacobson, K.B. et Turner, J.E. (1980) The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. Toxicology, **16**, 1-37.
- Jamil, K. et Hussain, S. (1992) Biotransfer of metals to insect *Neochitina eichornae* via aquatic plants. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **22**, 459-463.
- Jansen, T., Rother, C., Steppuhn, J., Reinke, H., Beyreuther, K., Jansson, C., Andersson, B. et Herrmann, R.G. (1987) Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the complete "23 kDa" and "16 kDa" precursor proteins associated with the photosynthetic oxygen-evolving complex from spinach. FEBS Lett., **216**, 234-240.
- Joliot, P. et Kok, B. (1975) Oxygen evolution in photosynthesis. In Govindjee Ed.: Bioenergetics of Photosynthesis. Academic Press: New York, pp. 387-392.
- Joliot, P., Barbieri, G. et Cahbaud, R. (1969) Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II. Photochem. Photobiol., **10**, 309-329.
- Kanner, S.B., Terrance, J.K., Grossmann, A., Hu, S.L., Bolen, J.B., Rabinovitch, P.S. et Ledbetter, J.A. (1992) Sulfhydryl oxidation down-regulates T-cell signaling and inhibits tyrosine phosphorylation of phospholipase C $\gamma$ 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 300-304.

- Karukstis, K. K. (1991) Chlorophyll fluorescence as a physiological probe of the photosynthetic apparatus. In H. Scheer (Ed.): Chlorophylls. CRC Press: Boca Raton, pp. 769-795.
- Katoh, S. et Takamiya, A. (1964) Nature of copper protein binding in spinach plastocyanin. J. Biochem., **55**, 378-387.
- Kavelaki, K. et Ghanotakis, D.F. (1991) Effect of the manganese complex on the binding of the extrinsic proteins (17, 23 and 33 kDa) of Photosystem II. Photosynth. Res., **29**, 149-155.
- Kelley, P.M. et Izawa, S. (1978) The role of chloride ion in photosystem II. I. Effects of chloride ion on photosystem II electron transport and on hydroxylamine inhibition. Biochim. Biophys. Acta, **502**, 198-210.
- Kessler, E. (1986) Limits of growth of five *Chlorella* species in the presence of toxic heavy metals. Arch. Hydrobiol. Suppl., **73**, 123-128.
- Kim, S., Pichersky, E. et Yocum, C. (1994) Topological studies of spinach 22 kDa protein of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta, **1188**, 339-348.
- Kimimura, M. and Katoh, S. (1972) Studies on electron transport associated with photosystem II. Functional site of plastocyanin; inhibitory effects of HgCl<sub>2</sub> on electron transport and plastocyanin in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, **283**, 279-292.
- Kleckowski, L.A. (1994) Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism. Ann. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol., **45**, 339-367.

- Kless, H. et Vermass, W. (1995) Many combinations of amino acid sequences in a conserved region of the D1 protein satisfy photosystem II function. J. Mol. Biol., **246**, 120-131.
- Kojima, Y, Hiyama, T. and Sakurai, H. (1987) Effect of mercurials on iron sulfur centres of PSI of *Anacystis nidulans*. In J. Biggins (Ed.): Progress in Photosynthesis Research. Nijhoff / Junk: The Hague, pp. 427-461,
- Kok, B., Forbush, B. et McGlem, M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution - I. A linear four step mechanism. Photochem. Photobiol., **11**, 457-475.
- Krause, G.H. et Weis, E. (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology - II. Interpretation of fluorescence signals. Photosynth. Res., **5**, 139-157.
- Krause, G.H. et Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Ann. Rev. Plant Physiol., **42**, 313-349.
- Krishtalik, L.I. (1990) Activation energy of photosynthetic oxygen evolution: An attempt at theoretical analysis. Bioelectrochem. Bioenerg., **23**, 249-263.
- Külbrandt, W. (1994) Structure and function of the light-harvesting complex, LHC-II. Curr. Opin. in Struct. Biol., **4**, 519-528.
- Külbrandt, W., Wang, D.N. et Fujiyoshi (1994). Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. Nature, **367**, 614-621.
- Kuwabara, T., Murata, T., Miyao, M. et Murata, M. (1985) The function of 33-kDa protein in the photosynthetic oxygen-evolution system studied by reconstitution experiments. Biochim. Biophys. Acta, **806**, 283-289.

- Laemli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Larsson, C., Jansson, U., Ljunberg, H.E., Åkerlund, H.E. et Andersson, B. (1984) Immunological analyses of the oxygen evolving complex with special emphasis on the 23 and 16 kDa. In Sybesma, C. (Ed.): Advances in Photosynthesis Research (vol. 1). Martinus Nijhoff: The Hague, pp. 363-366.
- Lavorel, J. et Etienne, J. (1977) *In vivo* chlorophyll fluorescence. In J. Barber (Ed.): Primary processes of photosynthesis. Elsevier: Amsterdam, pp. 203-268.
- Ljungberg, U., Åkerlund, H.E., et Andersson, B. (1986) Isolation and characterization of the 10-kDa and 22-kDa polypeptides of higher plant photosystem 2. J. Biochem., 158, 477-482.
- Ljungberg, U., Åkerlund, H.E., Larsson, C. et Andersson, B. (1984) Identification of polypeptides associated with the 23 and 33 kDa proteins of photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta, 767, 145-152.
- Lundblab, R.L. (1995) Techniques in protein modification. CRC Press: Boca Raton, Florida.
- Lundblab, R.L. et Noyes, C.M. (1984) Chemical reagents for protein modification. CRC Press: Boca Raton, Florida.
- Machold, O. (1986) Relationship between the 43 kDa chlorophyll-protein of PSII and the rapidly metabolized 32 kDa QB protein. FEBS Lett., 204, 363-367.
- Mader, S. (1989) Biologie - Évolution, diversité et environnement. Trécarré: Saint Laurent.

- Makymiec, W. et Baszinski, T. (1988) The effect of  $\text{Cd}^{2+}$  on the release of proteins from thylakoid membranes of tomato leaves. Acta Soc. Bot. Pol., **57** (4), 465-474.
- Mei, R. et Yocum, C. (1993) Characterization of inhibitory effects of  $\text{NH}_2\text{OH}$  and its N-methyl derivatives on the  $\text{O}_2$ -evolving complex of photosystem II. Photosynth. Res., **38**, 449-453.
- Meryman, H.T. et Williams, R.J. (1985) Basic principles of freezing injury to plant cells: natural tolerance and approaches to cryopreservation. In Kartha, K.K. (Ed.): Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press: Boca Raton, pp. 13- 47.
- Metz, J.G., Nixon, P.H., Roegner, M., Brudvig, G.W. et Diner, B.A. (1989) Directed alteration of the D1 polypeptide of photosystem II: Evidence that tyrosine-161 is the redox component, Z, connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P680. Biochemistry, **28**, 6960-6969.
- Miller M. et Cox, R.P. (1984) Inhibition of photosynthetic oxygen evolution in non-vesicular preparations releases  $\text{Mn}^{2+}$  into a restricted compartment. Biochem. Biophys. Res. Comm., **119**, 168-172.
- Miller, M. (1985) The release of polypeptides and manganese from oxygen-evolving photosystem II preparations following zinc-treatment. FEBS Lett., **189** (2), 355-360.
- Miller, N. et Carpentier, R. (1991) Energy dissipation and photoprotection mechanisms during chlorophyll photobleaching in thylakoid membranes. Photochem. Photobiol., **54**(3), 465-472.



- Millner, P.A., Gogel, N. et Barber, J. (1987) Investigation of the spatial relationships between photosystem 2 polypeptides by reversible crosslinking and diagonal electrophoresis. Photosynth. Res., **13**, 185-198.
- Mishra, R.K. et Ghanotakis, D.F. (1994) Selective extraction of CP26 and CP29 proteins without affecting the binding of the extrinsic proteins (33, 23 and 17 kDa) and the DCMU sensitivity of a Photosystem II core complex. Photosynth. Res., **42**, 37-42.
- Miyao, M. et Murata, N. (1983a) Partial desintegration and reconstitution of the photosynthetic oxygen evolution system - Binding of 24 and 18 kilodalton polypeptides. Biochim. Biophys. Acta, **725**, 87-93.
- Miyao, M. et Murata, N. (1983b) Partial reconstitution of the photosynthetic oxygen evolution system by rebinding of 33-KDa polypeptide. FEBS Lett., **164**, 375-378.
- Miyao, M. et Murata, N. (1984a) Role of the 33 kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolution system and its replacement by chloride ions. FEBS Lett., **170**, 350-354.
- Miyao, M. et Murata, N. (1984b) Effect of urea on photosystem II particles - Evidence for an essential role of the 33 kilodalton polypeptide in photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta, **765**, 253-257.
- Miyao, M. et Murata, N. (1989) The mode of binding of three extrinsic proteins of 33 kDa, 23 kDa and 18 kDa in the Photosystem II complex of spinach. Biochim. Biophys. Acta, **977**, 315-321.

- Morishige, D.T. et Thornber, J.P. (1992) Identification and analysis of a barley cDNA clone encoding the 31 kDa LHCIIa (CP29) apoprotein of the light harvesting antenna complex of photosystem II. Plant Physiol., **98**, 238-245.
- Morissette, J.C. (1991) Étude de la dissipation de l'énergie lumineuse dans les plantes et les membranes du chloroplaste à l'aide d'un thermo-fluorimètre intégral. Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 176 pages.
- Morissette, J.C. et Popovic, R. (1987) A new method for the separation of the constant and the variable fluorescence of chlorophyll *a* *in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **149**(2), 385-390.
- Morissette, J.C., Meunier, P.C. and Popovic, R. (1988) Automatic integrating fluorometer using an Apple-II and Scope-85. Rev. Sci. Instrum., **59**, 934-936.
- Morissette, J.C., Meunier, P.C. et Popovic, R. (1988) Automatic integrating fluorometer using an Apple-II and Scope-85. Rev. Sci. Instrum., **59**(6), 934-936.
- Morris, J. et Hermann, R.G. (1984) Nucleotide sequence of the gene for the P680 chlorophyll *a* apoprotein of the photosystem II reaction center from spinach. Nucl. Acids Res., **12**, 2837-2850.
- Murata, N., Kajimura, H., Fujimura, Y., Miyao, M., Murata, T., Watanabe, A. et Shinozaki, K. (1987) Partial amino acid sequences of the proteins of pea and spinach photosystem II complex. In J. Biggins (Ed.): Progress in Photosynthesis Research (vol. 1). Martinus Nijhoff: Dordrecht, pp. 701-704.
- Murata, N., Higashi, S. et Fujimura, Y. (1990) Glycerolipids in various preparation of photosystem II from spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, **1019**, 261-268.

- Murata, N. et Miyao, M. (1985) Extrinsic membranes proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. TIBS, **10**, 121-124.
- Murata, N. et Miyao, M. (1987) Oxygen-evolving complex of photosystem II in higher plants. In J. Biggins (Ed.): Progress in Photosynthesis Research (vol.1). Martinus Nijhoff Publishers: Dordrecht, pp. 453-462.
- Murata, N., Miyao, M., Omata, T., Matsunami, H. et Kuwabara, T. (1984) Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with Triton X-100 from spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, **765**, 363-369.
- Murphy, D.J. (1986) The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants. Biochim. Biophys. Acta, **864**, 33-94.
- Murthy, S.D.S., Bukhov, N.G. et Mohanty, P. (1990) Mercury-induced alterations of chlorophyll *a* fluorescence kinetics in cyanobacteria: multiple effects of mercury on electron transport. J. Photochem. Photobiol., **6**, 373-380.
- Murthy, S.D.S., Sabat, S.C. et Mohanty, P. (1989) Mercury-induced inhibition of photosystem II activity and changes in the emission of fluorescence from phycobilisomes in intact cells of the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. Plant Cell Physiol., **30**, 1153-1157.
- Nakatani, H.Y. (1984) Photosynthetic oxygen evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24 kilodaltons. Biochem. Biophys. Res. Commun., **120**, 299-304.

- Nakatani, H.Y., Ke, B., Dolan, E. et Arntzen, C.J. (1984) Identity of the photosystem II reaction center polypeptide. Biochim. Biophys. Acta, **765**, 347-352.
- Nanba, O. et Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D1 and D2 polypeptides and cytochrome *b559*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, **84**, 109-112.
- Nixon, P.J. et Diner, B.A. (1992) Aspartate 170 of the photosystem II reaction center polypeptide D1 is involved in the assembly of the oxygen-evolving manganese cluster. Biochemistry, **31**, 942-948.
- Nixon, P.J., Chrisholm, D.A. et Diner, B.A. (1992) Isolation and functional analysis of random and site-directed mutants of photosystem II. In P. Shewry et S. Gutteridge (Eds): Plant Protein Engineering. Cambridge: Cambridge Univ. Press, pp. 93-141.
- Nriagu, J.O., Pfeiffer, W.C., Malm, O., Magalhaes de Souza, C.M. (1992) Mercury pollution in Brazil. Nature, **356**, 389.
- Oettmeier, W. (1992) Herbicides of photosystem II. In J.Barber (Ed.): The Photosystems: Structures, Function and Molecular Biology. Elsevier: Amsterdam, pp. 349-408.
- Oh-Oka, H., Tanaka, S., Wada, K., Kuwabara, T. et Murata, N. (1986) Complete amino acid sequence of 33 kDa protein isolated from spinach photosystem II particles. FEBS Lett., **197**, 63-66.
- Olive, J. et Vallon, O. (1991) Structural organization of the thylakoid membrane: Freeze-fracture and immunocytochemical analysis. J. Electron Microsc. Techn., **18**, 360-374.
- Ono, T. et Inoue, Y. (1984)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent restoration of  $\text{O}_2$ -evolving activity in  $\text{CaCl}_2$ -washed PSII particles depleted of 33, 24 and 16 kDa polypeptides. FEBS lett., **168**, 281-286.

- Ono, T. et Inoue, Y. (1988) Discrete extraction of the Ca atom functional for O<sub>2</sub> evolution in higher plant PSII by a simple low pH treatment. FEBS lett., **227**, 147-152.
- Overnell, J. (1976). Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. Mar. Biol., **38**, 335-342.
- Pauly, S. et Witt, H.T. (1992) Are there really four manganese ions per centre of photosynthetic water oxidation? Biochim. Biophys. Acta, **1099**, 211-218.
- Pépin, R. (1993) Sur la piste du mercure. Réseau, avril, 8-10.
- Phillbrick, J.B., Diner, B.A. et Zilinskas, B.A. (1991) Construction and characterization of cyanobacterial mutants lacking the manganese-stabilizing polypeptide of Photosystem II. J. Biol. Chem., **266**, 13370-13376.
- Popovic, R., Beauregard, M. et Leblanc, R. M. (1987a). Photosynthetic action spectra of the energy storage in bundle sheath of Zea mays. Biochem. Biophys. Res. Commun., **144**, 198-202.
- Popovic, R., Beauregard, M. et Leblanc, R.M. (1987b) Study of energy storage in bundle sheath cells of Zea mays. Plant Physiol., **84**, 1437-1441.
- Popovic, R., Carpentier, R. et Morin, L. (1988) Determination of fluorescence inductions in a PSII submembrane fraction affected by additives. J. Plant Physiol., **132**, 754-757.
- Porter, G. (1979) Préface. Robert Hill: An eightieth birthday tribute.
- Putnam-Evans, C. et Bricker, T. (1994) Site-directed mutagenesis of the CP47 protein of photosystem II: Alteration of the basic residue 448R to 448G prevents the assembly of

- functional photosystem II centers under chloride-limiting conditions. Biochemistry, **33**, 10770-10775.
- Radmer, R. et Kok, B. (1975) Kinetic observation of the system II electron acceptor pool isolated by mercuric ion. Biochim. Biophys. Acta, **357**, 177-180.
- Rashid, A., Camm, E.L. et Ekramoddoullah, A.K.M. (1994) Molecular mechanism of action of  $PB^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  on water oxidizing complex of photosystem II. FEBS Lett., **350**, 296-298.
- Rashid, A. et Carpentier, R. (1990) The 16 and 23 kDa extrinsic polypeptides and the associated  $Ca^{2+}$  and  $Cl^-$  modify atrazine interaction with the photosystem II core complex. Photosynth. Res., **24**, 221-227.
- Rashid, A., Bernier, M., Pazdernick, L. et Carpentier, R. (1991) Interaction of  $Zn^{2+}$  with the donor side of photosystem II. Photosynth. Res., **30**, 123-130.
- Renger, G. (1978) Theoretical studies about the functional and structural organisation of the photosynthetic oxygen evolution. In Metzner, H. (Ed.): Photosynthetic Oxygen Evolution. Academic Press: New York, pp. 229-298.
- Renger, G. (1992) Energy transfer and trapping in photosystem II. In J. Barber (Ed.): The photosystems: Structure, Function and Molecular Biology. Elsevier: Amsterdam, pp. 45-99.
- Ringbom, A. (1967) Les complexes en chimie analytique. Dunod: Paris.
- Riordan, J.F. (1979) Arginyl residues and anions binding sites in proteins. Mol. Cell. Biochem., **26**, 71-91.

- Rochaix, J.D. et Erickson, J. (1988) Function and assembly of photosystem II: genetic and molecular analysis. TIBS, 13, 56-59.
- Rutherford, A.W. (1989) Photosystem II, the water splitting enzyme. TIBS, 14, 227-232.
- Salisbury, F.B. et Ross, C.W. (1992) Plant Physiology (4ème ed.). Wadsworth: Belmont, Ca.
- Samson, G. (1989) Modifications du transport d'électrons dans le photosystème II inhibé par le mercure et le cuivre. Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 137 pages.
- Samson, G. and Popovic, R. (1990) Inhibitory effects of mercury on photosystem II photochemistry in *Dunaliella tertiolecta* under *in vivo* conditions. J. Photochem. Photobiol., 5, 303-310.
- Samson, G., Morissette, J-C et Popovic, R. (1990) Determination of four apparent mercury interaction sites in photosystem II by using a new modification of the Stern-Volmer analysis. Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 1113-1119.
- Sandusky, P.O. et Yocum, C.F. (1986) The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution: Factors affecting nucleophilic displacement of chloride from the oxygen evolving complex. Biochim. Biophys. Acta, 849, 85-93.
- Sayre, R.T. et Wrobel-Boerner, E.A. (1994) Molecular topology of the Photosystem II chlorophyll *a* binding protein, CP43: topology of a thylakoid membrane protein. Photosynth. Res., 20, 11-19.
- Scott, C.D. (1992) Removal of dissolved metals by plant tissue. Biotechn. and Bioeng., 39, 1064-1068.

- Segel, I. H. (1976) Enzyme kinetics. Wiley: Toronto.
- Seibert, M., Tamura, N. et Inoue, Y. (1989) Lack of photoactivation capacity in *Scenedesmus obliquus* LF-1 results from loss of half the high-affinity manganese binding sites. Relationship to the unprocessed D1 protein. Biochim. Biophys. Acta, **974**, 185-191.
- Staehlin, L.A. (1986) Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. In L.A. Staehlin et C.J. Arntzen (Eds): Encyclopedia of plant physiology, New series (vol. 19), Photosynthesis III. Springer-Verlag: Berlin, pp. 1-84.
- Svensson, B., Vass, I. et Styring, S. (1991) Sequence analysis of the D1 and D2 reaction center proteins of photosystem II. Z. Naturforsch., **46c**, 765-776.
- Svensson, B., Vass, I., Cedergren, E. et Styring, S. (1990) Structure of donor side components in photosystem II predicted by computer modeling. EMBO J., **9**, 2051-2059.
- Tae, G.S., Black, M.T., Cramer, W.A., Vallon, O. et Bogorad, I. (1988) Thylakoid membrane protein topography: trans-membrane orientation of the chloroplasts cytochrome *b-559* psbE gene product. Biochemistry, **27**, 9075-9080.
- Tamura, N., Ikeuchi, M. et Inoue, Y. (1989). Assignment of histidine residues in D1 protein as possible ligands for functional manganese in photosynthetic water-oxidizing complex. Biochim. Biophys. Acta, **973**, 281-289.
- Tanaka S. et Wada, K. (1989) The status of cysteine residues in the extrinsic 33 kDa protein of spinach photosystem II complexes. Photosynth. Res., **17**, 255-266.



- Tang, X.S., Diner, B.A., Larsen, B.S., Gilchrist, M.L., Lorigan, G.A. et Britt, D.A. (1994) Identification of histidine at the catalytic site of the photosynthetic oxygen-evolving complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 704-708.
- Teige, M., Huchzermeyer, B. et Schultz, G. (1990) Inhibition of chloroplast ATPsynthase/ATPase is a primary effect of heavy metal toxicity in spinach plants. Biochem. Physiol. Pflanzen, **186**, 165-168.
- Terramani, T., Kessler, M., Lynch, G. et Baudry, M. (1988) Effects of thiol-reagents on [<sup>3</sup>H]α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid binding to rat telencephalic membranes. Mol. Pharmacol., **34**, 117-123.
- Theg, S.M. et Homann, P.H. (1982) Light, pH and uncoupler-dependent association of chloride with chloroplast thylakoids. Biochim. Biophys. Acta, **697**, 221-234.
- Theg, S.M., Jursinic, P.A. et Homann, P.H. (1984) Studies on the mechanism of chloride action on photosynthetic water oxydation. Biochim. Biophys. Acta, **766**, 636-646.
- Thompson, L.K. et Brudvig, G.W. (1988) Cytochrome *b*-559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. Biochemistry, **27**, 6653-6658.
- Trebst, A. (1980) Inhibitors in electron flow: Tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. Methods Enzymol., **69**, 675-721.
- Trebst, A. (1986) The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. Z. Naturforsch., **41c**, 240-245.
- van Coillie, R. (1992) Agression toxique détaillée d'agents persistants inorganiques - Cas type du mercure. Notes du cours "Toxicologie" - U. du Québec à Trois-Rivières.

- Vermass, W. (1993) Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structure and function. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol., **44**, 457-481.
- Vermass, W. (1994) Molecular-genetic approaches to study photosynthetic and respiratory electron transport in thylakoids from cyanobacteria. Biochim. Biophys. Acta, **1187**, 181-186.
- Vermass, W.F.J., Charité, J. et Shen, J. (1990) Glu-69 of the D2 protein in photosystem II is a potential ligand to Mn involved in photosynthetic oxygen evolution. Biochemistry, **29**, 5325-32.
- Vermass, W. et Ikeuchi, M. (1991) Photosystem II. In L. Bogorad et I.K. Vasil (Eds): The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation. Academic Press: San Diego, pp. 25 -110.
- Vermass, W., Styring, S., Schröder, W.P. et Andersson, B. (1993) Photosynthetic water oxidation: The protein framework. Photosynth. Res., **38**, 2402-63.
- Vermass, W., Williams, J. et Arntzen, C. (1987) Sequencing and modification of *psb B*, the gene encoding the CP47 protein of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. Plant Mol. Biol., **8**, 317-326.
- Volker, M., Ono, Y., Inoue, Y. et Renger, G. (1985) Effect of trypsin on PS II particles. Correlation between Hill activity, Mn-abundance and peptide pattern. Biochim. Biophys. Acta, **806**, 25-34.
- Waggonner, C.H., Pecoraro, V. et Yocum, C.F. (1989) Monovalent cations (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>) inhibit calcium activation of photosynthetic oxygen evolution. FEBS Lett., **244**, 237-240.

- Wales, R. Newman, B.J., Pappin, D. et Gray, J.C. (1989) The extrinsic 33 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of Photosystem II is a putative calcium-binding protein and is encoded by a multi-gene family in pea. Plant Mol. Biol., 12, 439-451.
- Wallace, R.A. (1983) Mercury in the environment. Oak Ridge: Tennessee.
- Weast, R.C. (1985) CRC Handbook of chemistry and physics (66ième Ed.). CRC Press: Boca Raton.
- Webb, J. (1976) Mercurials in enzyme and metabolic inhibition II. Academic Press: New York, pp. 729-985.
- Webber, A.N., Packman, L.C., Chapman, D.J., Barber, J. et Gray, J.C. (1989) A fifth chloroplast encoded polypeptide is present in the photosystem II reaction center complex. FEBS Lett., 242, 259-262.
- Whitmarsh, J. (1986) Mobile electron carriers in thylakoids. In L.A. Staehelin et C.J. Arntzen (Eds): Encyclopedia of Plant Physiology (vol. 19). Springer-Verlag: Berlin, pp. 508-527.
- Witt, H.T. (1987) Examples for the cooperation of photons, excitons, electrons, electric fields and protons in the photosynthesis membrane. New J. Chem., 11, 91-101.
- Witt, H.T. (1991) Functional mechanism of water splitting photosynthesis. Photosynth. Res., 29, 55-77.
- Wollman, F.A. (1991) Proteins in photosynthesis: when molecular genetics extends biophysical knowledge. The New Biologist, 3(12), 1169-1176.

- Wydrzinski, T., Ångström, J. et Vanngård, T. (1989)  $\text{H}_2\text{O}_2$  formation by Photosystem II. Biochim. Biophys. Acta, **973**, 23-28.
- Wydrzinski, T. et Sauer, K. (1980) Periodic changes in the oxidation state of manganese in photosynthetic oxygen evolution upon illumination with flashes. Biochim. Biophys. Acta, **589**, 56-70.
- Wydrzinski, T., Baumgart, F., MacMillan, F. and Renger, G. (1990) Is there a direct chloride cofactor requirement in the oxygen-evolving reactions of photosystem II? Photosynth. Res., **25**, 59-72.
- Xu, Q. et Bricker, T.M. (1992) Structural organization of proteins on the oxidizing side of photosystem II - Two molecules of the 33-kDa manganese-stabilizing proteins per reaction center. J. Biol. Chem., **267(36)**, 25816-25821.
- Xu, Q., Nelson, J. et Bricker, T. (1994) Secondary structure of the 33 kDa, extrinsic protein of Photosystem II: a far-UV circular dichroism study. Biochim. Biophys. Acta, **1188**, 427-431.
- Yamamoto, Y. (1988) Organization of the oxygen-evolution enzyme complex studied by butanol/water phase partitioning of spinach photosystem II particles. J. Biol. Chem., **263**, 497-500.
- Yocum, C.F. (1991) Calcium activation of photosynthetic water oxydation. Biochim. Biophys. Acta, **1059**, 1-15.
- Yocum, F.Y. et Guikema, J.A. (1977) Photophosphorylation associated with photosystem II cyclic photophosphorylation catalyzed by phenylenediamine. Plant Physiol., **49**, 33-37.

Ziegler, D.M. (1985) Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. Ann. Rev. Biochem., **54**, 305-329.

Zimmerman, W.B., Byun, E., McKinney, D. et Sokol, P. (1991) Sulfhydryl groups are essential for organic cation exchange in rabbit renal basolateral membrane vesicles. J. Biol. Chem., **266**(9), 5459-5463.